

1

DESCRIPTION

PARAMYXOVIRAL VECTORS ENCODING ANTIBODIES, AND USES THEREOF

5 Technical Field

The present invention relates to paramyxoviral vectors encoding polypeptides that comprise antibody variable regions, and uses thereof.

10 Background Art

The usefulness of monoclonal antibodies as medicines has been broadly recognized, and no less than ten kinds of monoclonal antibody medicines are already on the market, or being prepared for marketing (Dickman, S., *Science* 280: 1196-1197, 1998). Monoclonal antibody medicines are characterized by their selectivity in binding to only one specific antigen, thus expressing their activity of inhibiting or eliminating that antigen. Therefore, their future medicinal development has been highly expected. However, the following problems with monoclonal antibody medicines have been pointed out: 1) they are usually prepared using mammalian hybridomas, which are generally expensive to produce, and 2) they lead to side effects such as fever, even if mild, because they are usually delivered by systemic administration. Although attempts have been made to produce antibodies using bacteria such as *Escherichia coli*, yeast, or insect cells, there is concern that differences in sugar chain modification and such may affect the biological activity of the antibodies, and the antigenicity of the antibody proteins.

30 Disclosure of the Invention

An objective of the present invention is to provide paramyxoviral vectors encoding polypeptides that comprise antibody variable regions, and uses thereof.

The present inventors considered that, if gene transfer vectors could be used to express monoclonal antibody medicines currently in wide use, and expected to be used more broadly in the future, the antibody medicines could be locally expressed near the focus of the

disease. They considered that this would very probably reduce side effects and, at the same time, solve the cost problems that always accompany the development of monoclonal antibody medicines.

Recently, various gene transfer vectors have been developed for gene therapy, and depending upon the type of vector, localized expression in gene-transferred cells can be expected. In particular, the present inventors have so far used *Sendai virus* (SeV) to develop a novel gene transfer vector, which can be used for gene introduction as well as gene therapy. SeV is a non-segmented minus strand RNA virus, belonging to *Paramyxovirus*, and is one of the murine parainfluenza viruses. The present inventors have newly constructed SeVs expressing monoclonal antibodies, and conducted experiments using these to establish novel gene therapies that express the monoclonal antibodies in living bodies. The present inventors used two types of SeVs, transmissible and transmission-deficient, to construct vectors carrying the Fab gene (H and L chains) of the neutralizing antibody (IN-1) for the axonal outgrowth inhibitor (NOGO). Both vectors were successfully reconstituted, and a transmissible-type vector of 2<sup>9</sup> HAU (about 5x 10<sup>8</sup> CIU/ml) and a transmission-deficient type (F gene-deficient type) vector of 2.7x 10<sup>7</sup> CIU/ml, were successfully recovered. Cells were transduced with these vectors, and bands of about 47 kDa under oxidizing conditions, and about 30 kDa under reducing conditions, were detected in their culture supernatants, indicating that a Fab antibody with bonded H and L chains was formed under oxidizing conditions. Since vectors expressing antibodies against axonal outgrowth inhibitors are expected to be applied to spinal cord injuries, the present vectors can be used in gene therapies for spinal cord injuries.

Furthermore, the present inventors discovered that the antibody-expressing paramyxoviral vectors are also useful as vectors with reduced immunogenicity. When a viral vector is administered to a living body, immune reaction to the introduced virus is induced, which eliminates the viral vector and inhibits long-term expression of the introduced gene. Under such conditions, multiple administrations of the vectors are also difficult. If the vector comprises the activity of suppressing induction of the immune reaction,

immunoreaction against the vector can be suppressed, and long-term expression and multiple (repeated) administrations of the introduced gene become possible. Hence, vectors expressing antibodies against immune signal molecules are effective. For example, by using a vector 5 to express an antibody against a molecule that transduces a co-stimulatory signal, which is a secondary signal that works with signals from T cell receptors (TCR) in immune cells such as T cells, antigens, and major histocompatibility complex (MHC) antigens, this second signal can be eliminated, and the T cells inactivated. Such 10 paramyxoviral vectors enable the suppression of cellular immunity against the vector, as well as the long-term expression of introduced genes.

Thus, the vectors provided in this invention are suitable for *in vivo* administration, particularly in gene therapies, and are 15 expected to be applied to various diseases and injuries. Further, since the paramyxoviral vectors enable introduced genes to be expressed in mammalian cells at extremely high levels, desired antibodies can also be produced in large quantities in these mammalian cells, including human cells. Thus, the antibody-expressing 20 paramyxoviral vectors are highly useful, not only clinically, but also industrially.

The present invention relates to paramyxoviral vectors encoding polypeptides that comprise antibody variable regions, and uses thereof, and more specifically to:

25 (1) a paramyxoviral vector encoding a polypeptide that comprises an antibody variable region;

(2) the viral vector of (1), wherein the paramyxovirus is a Sendai virus;

(3) the viral vector of (1), wherein the polypeptide is a secretory 30 type;

(4) the paramyxoviral vector of (1), wherein the vector encodes a polypeptide comprising an antibody H chain variable region, and a polypeptide comprising an antibody L chain variable region;

(5) the viral vector of (4), wherein the polypeptide comprising an 35 antibody H chain variable region and the polypeptide comprising an antibody L chain variable region are linked to each other to form

a Fab;

(6) the viral vector of (5), wherein at least one of the antibody variable regions is derived from an antibody against a ligand or a receptor;

5 (7) the viral vector of (6), wherein the antibody binds to a factor that inhibits the survival or differentiation of neurons or the axonal outgrowth;

(8) the viral vector of (7), wherein the antibody is an antibody against a NOGO;

10 (9) the viral vector of (6), wherein the antibody is an antibody against a receptor associated with immune signal transduction, or a ligand thereof;

(10) the vector of (9), wherein the antibody is an antibody against a receptor expressed on the surface of a T cell or antigen-presenting

15 cell, or a ligand thereof;

(11) the vector of (10), wherein the receptor or ligand thereof is a signal transduction molecule of a costimulatory signal of a T cell or antigen-presenting cell;

20 (12) the vector of (11), wherein the signal transduction molecule is a molecule selected from the group consisting of CD28, CD80, CD86, LFA-1, ICAM-1 (CD54), PD-1, and ICOS;

(13) the vector of (9), wherein the vector further encodes another foreign gene;

25 (14) a method for manufacturing a recombinant polypeptide comprising an antibody variable region, wherein the method comprises the steps of:

(a) transducing the viral vector of (1) to a mammalian cell; and  
(b) recovering a produced polypeptide from the mammalian cell transduced with the vector, or the culture supernatant thereof;

30 (15) a polypeptide produced by the method of (14);

(16) a method for promoting nerve formation, wherein the method comprises the step of delivering the vector of (7) to a site in which the nerve formation is required;

35 (17) a method for treating a spinal cord lesion, wherein the method comprises the step of delivering the vector of (7) to the lesion site;

(18) a method for suppressing an immune reaction, wherein the method

comprise's the step of administering the vector of (9);

(19) the method of (18), wherein the method further comprises the step of administering an antibody against a receptor associated with immune signal transduction, or a ligand thereof, or CTLA-4 or a fragment thereof;

(20) a method for increasing the expression of a gene from a vector by prolonging gene expression from the vector, and/or by the repeated administration of the vector, wherein the method comprises the step of administering the vector of (9);

(21) the method of (20), wherein the method further comprises the step of administering an antibody against a receptor associated with immune signal transduction, or a ligand thereof, or CTLA-4 or a fragment thereof;

(22) a composition of a vector with elevated durability of expression, comprising the vector of (9) and a pharmaceutically acceptable carrier; and

(23) a gene transduction kit, comprising (a) the vector of (9) and (b) an antibody against a receptor associated with immune signal transduction, or a ligand thereof, or CTLA-4 or a fragment thereof.

Herein, "antibody" is a general term for polypeptides comprising immunoglobulin variable regions, and more specifically includes immunoglobulin chains (H or L chains), fragments comprising variable regions thereof, and polypeptides comprising these fragments.

Antibodies may be natural or artificially produced. For example, they may be chimeras of two or more antibodies (for example, a chimeric antibody of a human antibody and another mammal's antibody). In this invention, "antibody" also includes recombinant antibodies (for example, humanized antibodies) constructed by Fc region substitutions or by CDR grafts. An "immunoglobulin variable region" refers to a

variable region of an immunoglobulin H or L chain (i.e.,  $V_H$  or  $V_L$ ) or a portion thereof. An L chain may be either a  $\kappa$  chain or  $\gamma$  chain.

In this invention, a variable region may comprise an amino acid sequence comprising any of the complementarity-determining regions (CDRs), and specifically, may comprise any of the CDR1, CDR2, and CDR3 of an H or L chain. Preferably, in this invention, immunoglobulin variable regions are regions comprising the three CDRs, CDR1, CDR2,

and CDR3, of an H or L chain. In the present invention, immunoglobulins include any class of immunoglobulin, for example, IgM, IgG, IgA, IgE, and IgD.

A recombinant virus means a virus produced via a recombinant polynucleotide. A recombinant polynucleotide refers to a polynucleotide in which nucleotides are not bound in a natural manner. Specifically, a recombinant polynucleotide is a polynucleotide whose binding has been artificially modified (cleaved or linked). Recombinant polynucleotides can be produced by gene recombination methods known in the art, by combining polynucleotide syntheses, nuclease treatments, ligase treatments, and so on. Recombinant proteins can be produced by expressing recombinant polynucleotides that encode the proteins. Recombinant viruses can be produced by expressing polynucleotides that encode viral genomes constructed by gene manipulations, and then reconstituting the viruses. "Recombinant proteins" refers to proteins produced via recombinant polynucleotides, or to artificially synthesized proteins.

In the present invention, a "gene" refers to a genetic substance, a nucleic acid encoding a transcription unit. Genes may be RNAs or DNAs. In this invention, a nucleic acid encoding a protein is referred to as a gene of that protein. Further, a gene may not encode a protein. For example, a gene encoding a functional RNA, such as a ribozyme or antisense RNA, is referred to as a gene of the ribozyme or antisense RNA. A gene may be a naturally occurring or artificially designed sequence. Furthermore, in the present invention, "DNA" includes both single-stranded and double-stranded DNAs. Moreover, "encoding a protein" means that a polynucleotide comprises an ORF that encodes an amino acid sequence of the protein in a sense or antisense strand, so that the protein can be expressed under appropriate conditions.

In this invention, a paramyxovirus refers to a virus belonging to Paramyxoviridae, or to derivatives thereof. Paramyxoviruses are a group of viruses with non-segmented negative strand RNA as their genome, and they include Paramyxovirinae (including *Respirovirus* (also referred to as *Paramyxovirus*), *Rubulavirus*, and *Morbillivirus*), and Pneumovirinae (including *Pneumovirus* and *Metapneumovirus*). Specific examples of *Paramyxovirus* applicable to the present invention

are Sendai virus, Newcastle disease virus, mumps virus, measles virus, respiratory syncytial virus (RS virus), rinderpest virus, distemper virus, simian parainfluenza virus (SV5), and human parainfluenza viruses 1, 2, and 3. More specifically, such examples include Sendai virus (SeV), human parainfluenza virus-1 (HPIV-1), human parainfluenza virus-3 (HPIV-3), phocine distemper virus (PDV), canine distemper virus (CDV), dolphin morbillivirus (DMV), peste-des-petits-ruminants virus (PDPR), measles virus (MV), rinderpest virus (RPV), Hendra virus (Hendra), Nipah virus (Nipah), 10 human parainfluenza virus-2 (HPIV-2), simian parainfluenza virus 5 (SV5), human parainfluenza virus-4a (HPIV-4a), human parainfluenza virus-4b (HPIV-4b), mumps virus (Mumps), and Newcastle disease virus (NDV). A more preferred example is a virus selected from the group consisting of Sendai virus (SeV), human parainfluenza virus-1 (HPIV-1), 15 human parainfluenza virus-3 (HPIV-3), phocine distemper virus (PDV), canine distemper virus (CDV), dolphin morbillivirus (DMV), peste-des-petits-ruminants virus (PDPR), measles virus (MV), rinderpest virus (RPV), Hendra virus (Hendra), and Nipah virus (Nipah). Viruses of this invention are preferably those belonging to 20 Paramyxovirinae (including *Respirovirus*, *Rubulavirus*, and *Morbillivirus*) or derivatives thereof, and more preferably those belonging to the genus *Respirovirus* (also referred to as *Paramyxovirus*) or derivatives thereof. Examples of viruses of the genus *Respirovirus* applicable to this invention are human 25 parainfluenza virus-1 (HPIV-1), human parainfluenza virus-3 (HPIV-3), bovine parainfluenza virus-3 (BPIV-3), Sendai virus (also referred to as murine parainfluenza virus-1), and simian parainfluenza virus-10 (SPIV-10). The most preferred paramyxovirus in this invention is Sendai virus. These viruses may be derived from natural strains, wild 30 strains, mutant strains, laboratory-passaged strains, artificially constructed strains, or the like.

In this invention, a "vector" is a carrier for introducing a nucleic acid into a cell. Paramyxoviral vectors are carriers derived from paramyxoviruses to introduce nucleic acids into cells. 35 Paramyxoviruses such as SeV are excellent gene transfer vectors. Since paramyxoviruses carry out transcription and replication only

in the cytoplasm of host cells, and since they don't have a DNA phase, chromosomal integration does not occur. Therefore, they do not give rise to safety problems caused by chromosomal aberrations, such as canceration or 'immortalization'. This 'characteristic' of paramyxoviruses contributes a great deal to safety when using a paramyxovirus as a vector. When used for foreign gene expression, SeV showed hardly any nucleotide mutation, even after continuous multiple passaging, indicating the high stability of its genome and the long-term stable expression of inserted foreign genes (Yu, D. et al., *Genes Cells* 2, 457-466 (1997)). SeV has further qualitative merits, such as flexibility in the size of genes to be inserted and in the packaging thereof, since it does not have a capsid structure protein. A transmissible SeV vector can introduce a foreign gene of at least 4 kb in size, and can simultaneously express two or more genes by adding transcription units. Thus, antibody H and L chains can be expressed from the same vector. (Example 1).

SeV is known to be pathogenic to rodents, causing pneumonia; however, it is not pathogenic to humans. This was supported by a previous report that nasal administration of wild type SeV to non-human primates does not show severe adverse effects (Hurwitz, J. L. et al., *Vaccine* 15: 533-540, 1997). The two points below, "high infectivity" and "high expression level", should also be noted as advantages. SeV vectors infect cells by binding to sialic acids in the sugar chains of cell membrane proteins. This sialic acid is expressed in almost all cells, giving rise to a broad infection spectrum, i.e., high infectivity. When a transmissible SeV replicon-based vector releases viruses, these viruses re-infect neighboring cells, replicating multiple ribonucleoprotein (RNP) copies in the cytoplasm of infected cells, and distributing these into daughter cells in line with cell division, and therefore continuous expression can be expected. Further, SeV vectors can be applied to an extremely wide range of tissues. This broad infectivity indicates the applicability of SeV vectors to various types of antibody-treatments (and analyses). Furthermore, their characteristic expression mechanism, wherein transcription and replication occurs only in the cytoplasm, has been shown to express inserted genes at very high levels (Moriya, C. et

al., FEBS Lett. 425(1) 105-111 (1998); WO00/70070). Furthermore, SeV vectors made non-transmissible by deleting an envelope gene have been successfully recovered (WO00/70070; Li, H.-O. et al., J. Virol. 74(14) 6564-6569 (2000)). Thus, SeV vectors have been improved to further enhance their "safety", while maintaining their "high infectivity" and "high expression levels".

These characteristics of SeV support the effectiveness of paramyxoviral vectors including SeV for gene therapy and gene transfer, and the likelihood that SeV will become a promising choice in gene therapy for *in vivo* or *ex vivo* antibody expression. In particular, vectors capable of co-expressing high levels of H and L chains without human toxicity have strong clinical possibilities. By inserting an antibody gene for treatment (and analysis) into a paramyxoviral vector, and causing the vector to function, the antibody gene can be locally expressed at high levels near the disease focus, and definite therapeutic effects can be expected, along with reduced side effects. Further, such vectors are also highly likely to solve the cost problems which always accompany the development of monoclonal antibody medicines. These effects are thought to be stronger for those paramyxoviral vectors, including SeV, that can induce strong transient expression of inserted genes.

Paramyxoviral vectors comprise paramyxovirus genomic RNAs. A genomic RNA refers to an RNA that comprises the function of forming an RNP with a viral protein of a paramyxovirus, such that a gene in the genome is expressed by the protein, and that nucleic acid is replicated to form daughter RNPs. Paramyxoviruses are viruses with a single-strand negative chain RNA in their genome, and such RNAs encode genes as antisense sequences. In general, in the paramyxoviral genome, viral genes are arranged as antisense sequences between the 3'-leader region and the 5'-trailer region. Between the ORFs of respective genes are a transcription ending sequence (E sequence) - intervening sequence (I sequence) - transcription starting sequence (S sequence), such that the RNA encoding the ORF of each gene is transcribed as an individual cistron. Genomic RNAs in a vector of this invention comprise the antisense RNA sequences encoding N (nucleocapsid)-, P (phospho)-, and L (large)-proteins, which are viral

proteins essential for the expression of the group of genes encoded by an RNA, and for the autonomous replication of the RNA itself. The RNAs may also encode M (matrix) proteins, essential for virion formation. Further, the RNAs may encode envelope proteins essential for virion infection. Paramyxovirus envelope proteins include F (fusion) protein that causes cell membrane fusion, and HN (hemagglutinin-neuraminidase) protein, essential for viral adhesion to cells. However, HN protein is not required for the infection of certain types of cells (Markwell, M.A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82(4): 978-982 (1985)), and infection is achieved with F protein only. The RNAs may encode envelope proteins other than F protein and/or HN protein.

Paramyxoviral vectors of this invention may be, for example, complexes of paramyxoviral genomic RNAs and viral proteins, that is, ribonucleoproteins (RNPs). RNPs can be introduced into cells, for example, in combination with desired transfection reagents. Specifically, such RNPs are complexes comprising a paramyxoviral genomic RNA, N protein, P protein, and L protein. On introducing an RNP into cells, cistrons encoding the viral proteins are transcribed from the genomic RNA by the action of viral proteins, and, at the same time, the genome itself is replicated to form daughter RNPs. Replication of a genomic RNA can be confirmed by using RT-PCR, Northern blot hybridization, or the like to detect an increase in the copy number of the RNA.

Further, paramyxoviral vectors of this invention are preferably paramyxovirus virions. "Virion" means a microparticle comprising a nucleic acid released from a cell by the action of viral proteins. Paramyxovirus virions comprise structures in which an above-described RNP, comprising genomic RNA and viral proteins, is enclosed in a lipid membrane (referred to as an envelope), derived from the cell membrane. Virions may have infectivity. Infectivity refers to the ability of a paramyxoviral vector to introduce nucleic acids in the vector into cells to which the virion has adhered, since they retain cell adhesion and membrane-fusion abilities. Paramyxoviral vectors of this invention may be transmissible or transmission-deficient vectors. "Transmissible" means that, when a viral vector is introduced into

a host cell, the virus can replicate itself within the cell to produce infectious virions.

For example, each gene in each virus belonging to Paramyxovirinae is generally described as below. In general, N gene is also described as "NP".

Respirovirus ··· N ··· P/C/V ··· M ··· F ··· HN ··· ··· ··· L

Rubulavirus ··· N ··· P/V ··· M ··· F ··· HN ··· (SH) ··· L

Morbillivirus ··· N ··· P/C/V ··· M ··· F ··· H ··· ··· ··· L

For example, the database accession numbers for the nucleotide sequences of each of the Sendai virus genes are: M29343, M30202, M30203, M30204, M51331, M55565, M69046, and X17218 for N gene; M30202, M30203, M30204, M55565, M69046, X00583, X17007, and X17008 for P gene; D11446, K02742, M30202, M30203, M30204, M69046, U31956, X00584, and X53056 for M gene; D00152, D11446, D17334, D17335, M30202, M30203, M30204, M69046, X00152, and X02131 for F gene; D26475, M12397, M30202, M30203, M30204, M69046, X00586, X02808, and X56131 for HN gene; and D00053, M30202, M30203, M30204, M69040, X00587, and X58886 for L gene.

Examples of viral genes encoded by other viruses are: CDV, AF014953; DMV, X75961; HPIV-1, D01070; HPIV-2, M55320; HPIV-3, D10025; Mapuera, X85128; Mumps, D86172; MV, K01711; NDV, AF064091; PDPR, X74443; PDV, X75717; RPV, X68311; SeV, X00087; SV5, M81442; and Tupaia, AF079780 for N gene; CDV, X51869; DMV, Z47758; HPIV-1, M74081; HPIV-3, X04721; HPIV-4a, M55975; HPIV-4b, M55976; Mumps, D86173; MV, M89920; NDV, M20302; PDV, X75960; RPV, X68311; SeV, M30202; SV5, AF052755; and Tupaia, AF079780 for P gene; CDV, AF014953; DMV, Z47758; HPIV-1, M74081; HPIV-3, D00047; MV, AB016162; RPV, X68311; SeV, AB005796; and Tupaia, AF079780 for C gene; CDV, M12669; DMV, Z30087; HPIV-1, S38067; HPIV-2, M62734; HPIV-3, D00130; HPIV-4a, D10241; HPIV-4b, D10242; Mumps, D86171; MV, AB012948; NDV, AF089819; PDPR, Z47977; PDV, X75717; RPV, M34018; SeV, U31956; and SV5, M32248 for M gene; CDV, M21849; DMV, AJ224704; HPN-1, M22347; HPIV-2, M60182; HPIV-3, X05303; HPIV-4a, D49821; HPIV-4b, D49822; Mumps, D86169; MV, AB003178; NDV, AF048763; PDPR, Z37017; PDV, AJ224706; RPV, M21514; SeV, D17334; and SV5, AB021962 for F gene; and, CDV, AF112189; DMV, AJ224705; HPIV-1, U709498; HPIV-2, D000865; HPIV-3, AB012132; HPIV-4A, M34033; HPIV-4B, AB006954; Mumps, X99040; MV, K01711; NDV, AF204872; PDPR, Z81358;

PDV, Z36979; RPV, AF132934; SeV, U06433; and SV-5, S76876 for HN (H or G) gene. However, a number of strains are known for each virus, and genes exist that comprise sequences other than those cited above, due to differences in strains.

5 The ORFs of these viral proteins are arranged as antisense sequences in the genomic RNAs, via the above-described E-I-S sequence. The ORF closest to the 3'-end of the genomic RNAs only requires an S sequence between the 3'-leader region and the ORF, and does not require an E or I sequence. Further, the ORF closest to the 5'-end 10 of the genomic RNA only requires an E sequence between the 5'-trailer region and the ORF, and does not require an I or S sequence. Furthermore, two ORFs can be transcribed as a single cistron, for example, by using an internal ribosome entry site (IRES) sequence. In such a case, an E-I-S sequence is not required between these two ORFs. In wild type 15 paramyxoviruses, a typical RNA genome comprises a 3'-leader region, six ORFs encoding the N, P, M, F, HN, and L proteins in the antisense and in this order, and a 5'-trailer region on the other end. In the genomic RNAs of this invention, as for the wild type viruses, it is preferable that ORFs encoding the N, P, M, F, HN, and L proteins are 20 arranged in this order, after the 3'-leader region, and before the 5'-trailer region; however, the gene arrangement is not limited to this. Certain types of paramyxovirus do not comprise all six of these viral genes, but even in such cases, it is preferable to arrange each 25 gene as in the wild type, as described above. In general, vectors maintaining the N, P, and L genes can autonomously express genes from the RNA genome in cells, replicating the genomic RNA. Furthermore, by the action of genes such as the F and HN genes, which encode envelope proteins, and the M gene, infectious virions are formed and released to the outside of cells. Thus, such vectors become transmissible viral 30 vectors. A gene encoding a polypeptide that comprises an antibody variable region may be inserted into a protein-noncoding region in this genome, as described below.

Further, a paramyxoviral vector of this invention may be 35 deficient in any of the wild type paramyxoviral genes. For example, a paramyxoviral vector that does not comprise the M, F, or HN gene, or any combinations thereof, can be preferably used as a paramyxoviral

vector of this invention. Such viral vectors can be reconstituted, for example, by externally supplying the products of the deficient genes. The viral vectors thus prepared adhere to host cells to cause cell fusion, as for wild type viruses, but they cannot form daughter virions that comprise the same infectivity as the original vector, because the vector genome introduced into cells is deficient in a viral gene. Therefore, such vectors are useful as safe viral vectors that can only introduce genes once. Examples of genes that the genome may be defective in are the F gene and/or HN gene. For example, viral vectors can be reconstituted by transfecting host cells with a plasmid expressing a recombinant paramyxoviral vector genome defective in the F gene, along with an F protein expression vector and expression vectors for the NP, P, and L proteins (WO00/70055 and WO00/70070; Li, H.-O. et al., J. Virol. 74(14) 6564-6569 (2000)). Viruses can also be produced by, for example, using host cells that have incorporated the F gene into their chromosomes. When supplying these proteins externally, their amino acid sequences do not need to be the same as the viral sequences, and a mutant or homologous gene from another virus may be used as a substitute, as long as their activity in nucleic acid introduction is the same as, or greater than, that of the natural type.

Further, vectors that comprise an envelope protein other than that of the virus from which the vector genome was derived, may be prepared as viral vectors of this invention. For example, when reconstituting a virus, a viral vector comprising a desired envelope protein can be generated by expressing an envelope protein other than the envelope protein encoded by the basic viral genome. Such proteins are not particularly limited, and include the envelope proteins of other viruses, for example, the G protein of vesicular stomatitis virus (VSV-G). The viral vectors of this invention include pseudotype viral vectors comprising envelope proteins, such as VSV-G, derived from viruses other than the virus from which the genome was derived. By designing the viral vectors such that these envelope proteins are not encoded in RNA genomes, the proteins will never be expressed after virion infection of the cells.

Furthermore, a viral vector of this invention may be, for example,

a vector with, on the envelope surface, a protein that can attach to a specific cell, such as an adhesion factor, ligand, receptor, antibody, or fragment thereof; or a vector comprising a chimeric protein with such a protein in the extracellular domain, and a 5 polypeptide derived from the virus envelope in the intracellular domain. Thus, vectors that target specific tissues can also be produced. Such proteins may be encoded by the viral genome, or supplied by expressing genes other than the viral genome at the time of viral vector reconstitution (for example, other expression vectors or genes 10 existing on host chromosomes).

Further, in the vectors of this invention, any viral gene comprised in the vector may be modified from the wild type gene in order to reduce the immunogenicity caused by viral proteins, or to enhance RNA transcriptional or replicational efficiency, for example. 15 Specifically, for example, in a paramyxoviral vector, modifying at least one of the N, P, and L genes, which are replication factors, is considered to enhance transcriptional or replicational function. Further, HN protein, which is an envelope protein, comprises both hemagglutinin activity and neuraminidase activity; however, it is 20 possible, for example, to improve viral stability in the blood if the former activity can be attenuated, and infectivity can be controlled if the latter activity is modified. Further, it is also possible to control membrane fusion ability by modifying F protein. For example, the epitopes of the F protein or HN protein, which can 25 be cell surface antigenic molecules, can be analyzed, and using this, viral vectors with reduced antigenicity to these proteins can be prepared.

Furthermore, vectors of this invention may be deficient in accessory genes. For example, by knocking out the V gene, one of the 30 SeV accessory genes, the pathogenicity of SeV toward hosts such as mice is remarkably reduced, without hindering gene expression and replication in cultured cells (Kato, A. et al., 1997, J. Virol. 71: 7266-7272; Kato, A. et al., 1997, EMBO J. 16: 578-587; Curran, J. et al., WO01/04272, EP1067179). Such attenuated vectors are 35 particularly useful as nontoxic viral vectors for *in vivo* or *ex vivo* gene transfer.

Vectors of this invention comprise nucleic acids encoding polypeptides that comprise an antibody variable region in the genome of the above-described paramyxoviral vectors. The polypeptides comprising antibody variable regions may be full-length (full body) natural antibodies, or fragments comprising an antibody variable region, as long as they recognize an antigen. Antibody fragments include Fab, F(ab')<sub>2</sub>, and scFv. A nucleic acid encoding an antibody fragment can be inserted at any desired position in a protein-noncoding region of the genome, for example. The above nucleic acid can be inserted, for example, between the 3'-leader region and the viral protein ORF closest to the 3'-end; between each of the viral protein ORFs; and/or between the viral protein ORF closest to the 5'-end and the 5'-trailer region. Further, in genomes deficient in the F or HN gene or the like, nucleic acids encoding antibody fragments can be inserted into those deficient regions. When introducing a foreign gene into a paramyxovirus, it is desirable to insert the gene such that the chain length of the polynucleotide to be inserted into the genome will be a multiple of six (Journal of Virology, Vol. 67, No. 8, 4822-4830, 1993). An E-I-S sequence should be arranged between the inserted foreign gene and the viral ORF. Two or more genes can be inserted in tandem via E-I-S sequences. Alternatively, a desired gene may be inserted though an IRES (internal ribosome entry site).

A vector of this invention may encode, for example, a polypeptide comprising an antibody H chain variable region, and a polypeptide comprising an antibody L chain variable region. These two polypeptides comprise one or more amino acids that bind each other. For example, a wild type antibody comprises a cysteine residue between the H chain constant regions C<sub>H</sub>1 and C<sub>H</sub>2, that binds the H chain and L chain with a disulfide bond. By expressing an antibody fragment that comprises this cysteine from the vector, it is possible to bind peptides derived from H and L chains to each other (Example 1). Alternatively, by adding tag peptides, which bind to each other, to the antibody fragment, peptides derived from H and L chains may be bound to each other using these tag peptides. In natural antibodies, two cysteines further exist in each H chain, forming two sets of disulfide bonds that bind the H chains to each other. H chains

comprising at least one of the cysteines bind each other, forming bivalent antibodies. Antibody fragments that lack the cysteines for H chain binding form monovalent antibodies, such as Fab.

In this invention, Fab means a complex of one polypeptide chain comprising an antibody H chain variable region, and one polypeptide chain comprising an L chain variable region. These polypeptides bind each other to form one (monovalent) antigen-binding site. Although Fab can typically be obtained by digesting an immunoglobulin with papain, antibody fragments comprising structures equivalent thereto are also referred to as Fab in this invention. Specifically, Fab may be a dimeric protein in which an immunoglobulin L chain binds to a polypeptide chain comprising an H chain variable region ( $V_h$ ) and  $C_{H1}$ . The C terminal site of the H chain fragment may not be cleaved with papain, and the fragment may be a fragment cleaved with another protease or agent, or it may be an artificially designed fragment. In this invention, Fab includes Fab' (obtained by digesting an immunoglobulin with pepsin, then cleaving the disulfide bond between the H chains) and Fab(t) (obtained by digesting an immunoglobulin with trypsin), since they have a structures equivalent to that of Fab. The class of immunoglobulin is not limited, and includes all classes, such as IgG and IgM. Typically, Fab comprises cysteine residues near the C-terminals of the H chain fragment and L chain fragment, so that both fragments can bind to each other via a disulfide bond. However, in this invention, Fab does not need to be bound by a disulfide bond, and for example, by adding peptide fragments that can bind to each other to L chain fragment and H chain fragment, both chains may be bound via these peptides to form a Fab.

In this invention,  $F(ab')_2$  means an antibody deficient in the antibody constant regions, or a protein complex comprising a structure equivalent thereto. Specifically,  $F(ab')_2$  refers to a protein complex comprising two complex units, each of which comprises one polypeptide chain comprising an antibody H chain variable region, and one polypeptide chain comprising an L chain variable region.  $F(ab')_2$  is a divalent antibody comprising two antigen binding sites, and the hinge region of the H chain, and is typically obtained by digesting an antibody with pepsin at near pH 4. However, in this invention,

5 F(ab')<sub>2</sub> may be produced by cleavage with another protease or agent, or may be artificially designed. Binding of the peptide chains may be via a disulfide bond, or by other linkages. The classes of immunoglobulin are not limited, and include all classes, such as IgG and IgM.

10 scFv refers to a polypeptide in which an antibody H chain variable region and L chain variable region are comprised in a single polypeptide chain. The H chain variable region and L chain variable region are linked via a spacer of length appropriate for binding to each other, thus forming an antigen binding site.

15 Expression levels of a foreign gene carried in a vector can be controlled using the type of transcriptional initiation sequence added upstream (to the 3'-side of the negative strand) of the gene (WO01/18223). The expression levels can also be controlled of the position at which the foreign gene is inserted in the genome: the nearer to the 3'-end of the negative strand the insertion position is, the higher the expression level; while the nearer to the 5'-end the insertion position is, the lower the expression level. Thus, to obtain a desired gene expression level, the insertion position of 20 a foreign gene can be appropriately controlled such that the combination with genes encoding the viral proteins before and after the foreign gene is most suitable. In general, since a high expression level of the antibody fragment is thought to be advantageous, it is preferable to link a foreign gene encoding an antibody to a highly 25 efficient transcriptional initiation sequence, and to insert it near the 3'-end of the negative strand genome. Specifically, a foreign gene is inserted between the 3'-leader region and the viral protein ORF closest to the 3'-end. Alternatively, a foreign gene may be inserted between the ORFs of the viral gene closest to the 3'-end 30 and the second closest viral gene. In wild type paramyxoviruses, the viral protein gene closest to the 3'-end of the genome is the N gene, and the second closest gene is the P gene. Alternatively, when a high level of expression of the introduced gene is undesirable, the gene 35 expression level from the viral vector can be suppressed to obtain an appropriate effect, for example, by inserting the foreign gene at a site in the vector as close as possible to the 5'-side of the

negative strand genome, or by selecting an inefficient transcriptional initiation sequence.

When two polypeptides, one comprising an H chain variable region and the other comprising an L chain variable region, are to be expressed from a vector, nucleic acids encoding the respective polypeptides are inserted into the vector genome. The two nucleic acids are preferably arranged in tandem via an E-I-S sequence. An S sequence with high transcriptional initiation efficiency is desirably used, and for example, 5'-CTTCACCT-3' (negative strand, SEQ ID NO: 1) can be preferable.

Vectors of this invention may maintain another foreign gene at a position other than that at which a gene encoding an antibody fragment has thus been inserted. Such foreign genes are not limited. For example, they may be marker genes for monitoring vector infection, or genes of cytokines, hormones, and other factors that regulate the immune system. Vectors of this invention can introduce a gene either by direct (*in vivo*) administration to a target site in a living body, or by indirect (*ex vivo*) administration in which a vector of this invention is introduced into cells from a patient, or other cells, and these cells are then injected into the target site.

Antibodies to be carried by the vectors of this invention may be antibodies against a host's soluble proteins, membrane proteins, structural proteins, enzymes, and such. They preferably include antibodies against secretory proteins associated with signal transduction, or receptors thereof, and antibodies against intracellular signaling molecules. For example, the antibodies include antibodies against extracellular receptor domains, or antibodies against receptor ligands (for example, antibodies against a receptor binding site of a ligand). By administering a vector that expresses such an antibody, ligand binding to the receptor is inhibited, thus blocking signal transduction via this receptor. In particular, the antibodies carried by the vectors of this invention are preferably those with therapeutic effects on diseases or injuries. There have been several reports of gene transfer vectors that carry antibody genes. Almost all of these reports aim at targeting the vectors. Reported examples of gene transfer vectors that carry antibody genes,

aimed at targeting, use, for example: retroviruses (Somia, N.V. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92(16) 7570-7574 (1995); Marin, M. et al., J. Virol. 70(5) 2957-2962 (1996); Chu, T.H. & Dornburg, R., J. Virol. 71(1) 720-725 (1997); Ager, S. et al., Hum. Gene Ther. 7(17) 2157-2167 (1997); Jiang, A. et al., J. Virol. 72(12) 10148-10156 (1998); Jiang, A. & Durnburg, R. Gene Ther. 6(12) 1982-1987 (1999); Kuroki, M. et al., Anticancer Res. 20(6A) 4067-4071 (2000); Pizzato, M. et al., Gene Ther. 8(14) 1088-1096 (2001); Khare, P.D. et al., Cancer Res. 61(1) 370-375 (2001)), adenoviruses (Douglas, J.T. et al., Nat. Biotechnol. 14(11) 1574-1578 (1996); Curiel, D.T. Ann. NY Acad. Sci. 886 158-171 (1999); Haisma, H.J. et al., Cancer Gene Ther. 7(6) 901-904 (2000); Yoon, S.K. et al., Biochem Biophys. Res. Commun. 272(2) 497-504 (2000); Kashentseva, E.A. et al., Cancer Res. 62(2) 609-616 (2002)), adeno-associated viruses (AAV) (Bartlett, J.S. et al., Nat. Biotechnol. 17(4) 393 (1999); MVA (Paul, S. et al., Hum. Gene Ther. 11(10) 1417-1428 (2000)), and measles viruses (Hammond, A.L. J. Virol. 75(5) 2087-2096 (2001)). In almost all cases, single-chain antibodies (scFv) were utilized, and many of these cases targeted cancer cells. By using vectors of this invention to prepare paramyxoviruses comprising such antibodies on the envelope surface, it is also possible to construct targeting vectors that infect specific cells. For example, by carrying a gene encoding an antibody against an inflammatory cytokine, such as interleukin(IL)-6 or fibroblast growth factor (FGF), a vector of this invention can be used as a targeting vector for autoimmune diseases such as rheumatoid arthritis (RA) and cancer. Application to cancer treatments that use these targeting vectors that express suicide genes or cancer vaccine proteins are highly expected.

However, the vectors of this invention also excel in that they can be applied to uses other than the above-described targeting. For example, this invention provides paramyxoviral vectors encoding antibodies with therapeutic effects on diseases or injuries. For example, with regards to cancer treatment by adenoviral vectors that carry an scFv gene for the anti-erbB-2 antibody as an intrabody (an antibody functioning within a cell) (Kim, M. et al., Hum. Gene Ther. 8(2) 157-170 (1997); Deshane, J. et al., Gynecol. Oncol. 64(3) 378-385,

(1997)), clinical research has hitherto been performed (Alvarez, R.D. & Curiel, D.T. *Hum. Gene Ther.* 8(2) 229-242 (1997); Alvarez, R.D. et al., *Clin. Cancer Res.* 6(8) 3081-3087 (2000)). With regards to scFv genes carried in adenoviral vectors for similar cancer treatments, 5 cases have been reported that investigate the same anti-erbB-2 antibody, not as an intrabody, but as a secretory type (Arafat, W.O. et al., *Gene Ther.* 9(4) 256-262 (2002)); cases that investigate the anti-4-1BB (T cell activation molecule) antibody (Hellstrom, Y.Z. et al., *Nat. Med.* 8(4) 343-348 (2002)); and cases that investigate 10 the anti-CEA (carcino-embryonic antigen) antibody (Whittington, H.A. et al., *Gene Ther.* 5(6) 770-777 (1998)), etc. These vectors mainly utilize scFv. Paramyxoviruses, encoding these antibodies, constructed using the vectors of this invention, will be useful as viral vectors for medical treatment that enable *in vivo* administration. 15 Since the vectors of this invention are not incorporated into host chromosomes and are thus safe, and also since they can express carried genes from usually over several days to several weeks, they can be applied to the treatment of various diseases and injuries. The vectors of this invention are excellent in that they can carry not only scFv, 20 as described above, but also the genes of both H and L chains, to express multimers such as Fab, F(ab')2, or full body (full-length) antibodies, and they can thus produce antibody complexes that comprise a number of chains. A vector encoding an H chain and L chain constituting Fab, a full body antibody (full-length antibody), a 25 fragment thereof, or the like, can be expected to be more therapeutically effective than a vector expressing an scFv.

The vectors of this invention are contemplated for various uses other than the above-mentioned applications to cancer treatment. For example, as diseases other than cancer, there have been reported 30 investigations aiming at HIV treatment with REV, gp120, or integrase as the target, using retroviral vectors (Ho, W.Z. et al., *AIDS Res. Hum. Retroviruss* 14(17) 1573-1580 (1998)); AAV vectors (Inouye, R.T. et al., *J. Virol.* 71(5) 4071-4078 (1997)), SV40 (BouHamdan, M. et al., *Gene Ther.* 6(4) 660-666 (1999)); or plasmids (Chen, S.Y. et al., 35 *Hum. Gene Ther.* 5(5) 595-601 (1994)). All of the above-described examples use scFv. With regards to other infectious diseases, cases

have been reported in which a full body anti-rabies virus antibody has been carried in a vaccine strain of rabies virus (Morimoto, K. et al., J. Immunol. Methods 252(1-2) 199-206 (2001)), as well as cases where the H chain and L chain of the full body anti-Sindbis virus antibody are carried in separate Sindbis viral vectors (Liang, X.H. Mol. Immunol. 34(12-13) 907-917 (1997)). These latter two cases successfully carried a full body antibody in a viral vector, and secreted large quantities of an active type virus. However, both reports relate to monoclonal antibody production systems, and do not in any way anticipate the direct administration of these vectors for the treatment of infectious diseases. Also, from the aspect of safety and the like, actual *in vivo* administration of the above vector as a treatment (in clinical applications) cannot be expected to achieve high localized expression of the antibody. In contrast, the vectors of this invention are excellent in that they can be suitably applied to both antibody production and gene therapy. In particular, the vectors of this invention are highly useful as vectors that carry antibody genes for gene therapies that are very safe for humans, since they are not pathogenic to humans. High localized expression of antibodies *in vivo* (in clinical application) can be expected by the local administration of the vectors of this invention as therapies.

Antibodies especially useful for expression from the vectors of this invention are those against molecules associated with intracellular as well as extracellular signal transductions. Of these, antibodies against ligands and receptors that suppress the survival and differentiation of nerves or axonal outgrowth are preferably applied in this invention. Such signal molecules include axonal outgrowth inhibitors, such as NOGO. Vectors expressing antibodies against the axonal outgrowth inhibitors enable novel gene therapies for nerve injuries.

Many tissues retain self-regenerative ability, even after injury. In the nervous system as well, the axons of peripheral nerves are able to elongate and regenerate after injuries such as cleavage or detrition. However, neurons in the central nervous system, such as the brain and spinal cord, show no post-injury axonal outgrowth, and do not comprise regenerative ability (Ramon y Cajal S, New York:

Hafner (1928); Schwab, M.E. and Bartholdi, D. *Physiol. Rev.* 76, 319-370 (1996)). However, it was demonstrated that even neurons of the central nervous system show axonal outgrowth when transplanted to peripheral tissues (David, S. and Aguayo, A.J. *Science* 214, 931-933 (1981)), and thus it was presumed that neurons of the central nervous system by nature comprise the activity of regenerating axons, but that the environment of the central nervous system inhibits axonal outgrowth, that is, a factor that inhibits neuronal regeneration (axonal outgrowth) is present in the central nervous system.

In fact, NOGO has been identified as an axonal outgrowth inhibitor (Prinjha, R. et al., *Nature* 403, 383-384 (2000); Chen, M.S. et al., *Nature* 403, 434-439 (2000); GrandPre, T. et al., *Nature* 403, 439-444 (2000)). There are three known NOGO isoforms: Nogo-A (Ac.No. AJ242961, (CAB71027)), Nogo-B (Ac.No. AJ242962, (CAB71028)), and Nogo-C (Ac.No. AJ242963, (CAB71029)), which are predicted to be splice variants. Axonal outgrowth inhibitory activity is greatest with the largest NOGO, Nogo-A (molecular weight about 250 kDa), but the active site is predicted to be the extracellular domain of 66 amino acids, commonly present in all three isoforms (GrandPre, T. et al., *Nature* 403, 439-444 (2000)). Therefore, a paramyxoviral vector encoding an antibody that binds to Nogo-A, Nogo-B, or Nogo-C can be preferably used to promote nerve formation. IN-1 is known as an anti-NOGO monoclonal antibody. IN-1 has been reported to neutralize the inhibition of axonal outgrowth due to oligodendrocytes and myelin *in vitro* (Caroni, P. and Schwab, M.E. *Neuron* 1, 85-96 (1988)). In an *in vivo* rat model in which a mechanical spinal cord injury was induced, IN-1 administration to injured parts was further reported to result in 5% of axons elongating over the injured part, achieving remarkable functional recovery (Bregman, B.S. et al., *Nature* 378, 498-501 (1995)). Thus, an neutralizing antibody against an *in vivo* factor comprising axonal outgrowth inhibitory activity in the central nerves is likely to be effective in the neuron regeneration of the central nervous system. In addition to NOGO, known factors comprising a similar activity (axonal outgrowth inhibitory activity) include semaphorin, ephrin, slit, and such (semaphorin: Genbank Ac. Nos. NM\_006080 (protein: NP\_006071), L26081 (AAA65938); ephrin: Ac. Nos.

NM\_001405 (NP\_001396), NM\_005227 (NP\_005218), NM\_001962 (NP\_001953), NM\_004093 (NP\_004084), NM\_001406 (NP\_001397); slit: Ac. Nos. AB017167 (BAA35184), AB017168 (BAA35185), AB017169 (BAA35186)) (Chisholm, A. and Tessier-Lavigne, M. *Curr. Opin. Neurobiol.* 9, 603-615 (1999)).

5 Even though they each play different roles, antibodies against these factors can enable axonal outgrowth, even in the central nervous system, which was not thought to regenerate. Such antibodies can thus be applied not only to spinal cord injuries, as shown with IN-1, but also to various nerve degenerative disorders.

10 Furthermore, antibodies against the following substances are also useful: myelin-associated glycoprotein (MAG) comprising a similar axonal outgrowth inhibitory activity as NOGO (ACCESSION NM\_002361 (NP\_002352), NM\_080600 (NP\_542167), Aboul-Enein, F. et al., *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 62 (1), 25-33 (2003); Schnaar, R.L. et al., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 845, 92-105 (1998); Spagnol, G. et al., *J. Neurosci. Res.* 24 (2), 137-142 (1989); Sato, S. et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 163 (3), 1473-1480 (1989); Attia, J. et al., *Clin. Chem.* 35 (5), 717-720 (1989); Quarles, R.H., *Crit Rev. Neurobiol.* 5 (1), 1-28 (1989); Barton, D.E. et al., *Genomics* 1 (2), 107-112 (1987);

15 McKerracher, L. et al. (1994) Identification of myelin-associated glycoprotein as a major myelin-derived inhibitor of neurite growth. *Neuron* 13: 805-811; Mukhopadhyay, G. et al. (1994) A novel role for myelin associated glycoprotein as an inhibitor of axonal regeneration. *Neuron* 13: 757-767; Tang, S. et al. (1997) Soluble myelin-associated glycoprotein (MAG) found in vivo inhibits axonal regeneration. *Mol. Cell Neurosci* 9: 333-346; Nogo receptor, a common receptor of NOGO and MAG (Nogo-66 receptor) (ACCESSION NM\_023004 (NP\_075380, Q9BZR6), Josephson, A., et al., *J. Comp. Neurol.* 453 (3), 292-304 (2002); Wang, K.C., et al., *Nature* 420 (6911), 74-78 (2002); Wang, K.C., et al., *Nature* 417 (6892), 941-944 (2002); Fournier, A.E., et al., *Nature* 409 (6818), 341-346 (2001); Dunham, I., et al., *Nature* 402 (6761), 489-495 (1999); Strausberg, R.L., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99 (26), 16899-16903 (2002); GrandPre, T. et al., *Nature* 417 (6888), 547-551 (2002); Liu, B.P. et al., *Science* 297 (5584), 1190-1193 (2002);

20 Woolf, C.J. and Bloechlinger, S., *Science* 297 (5584), 1132-1134 (2002); Ng, C.E. and Tang, B.L., *J. Neurosci. Res.* 67 (5), 559-565

(2002)), extracellular matrix around glia such as chondroitin sulfate proteoglycan (CSPG) exerting the inhibitory action on the axonal outgrowth (Rudge, JS, Silver, J. (1990). Inhibition of neurite outgrowth on astroglial scars in vitro. *J. Neurosci* 10: 3594-3603;

5 McKeon, RJ, et al. (1999) The chondroitin sulfate proteoglycans neurocan and phosphacan are expressed by reactive astrocytes in the chronic CNS glial scar. *J Neurosci* 19: 10778-10788; Smith-Thomas, LC et al. (1995) Increased axon regeneration in astrocytes grown in the presence of proteoglycan synthesis inhibitors. *J Cell Sci* 108:

10 Davies, SJA, et al. (1997) Regeneration of adult axons in white matter tracts of the central nervous system. *Nature* 390: 680-683; Fidler, PS et al. (1999) Comparing astrocytic cell lines that are inhibitory or permissive for axon growth: the major axon-inhibitory proteoglycan is NG2. *J Neurosci* 19:8778-8788), NG2 15 in particular (Levine, JM et al. (1993) Development and differentiation of glial precursor cells in the rat cerebellum. *Glia* 7: 307-321), neurocan (Asher, RA et al. (2000) Neurocan is upregulated in injured brain and in cytokine-treated astrocytes. *J Neurosci* 20: 2427-2438; Haas, CA, et al. (1999) Entorhinal cortex lesion in adult 20 rats induces the expression of the neuronal chondroitin sulfate proteoglycan neurocan in reactive astrocytes. *J Neurosci* 19: 9953-9963), phosphacan (McKeon, RJ et al. (1999) The chondroitin sulfate proteoglycans neurocan and phosphacan are expressed by reactive astrocytes in the chronic CNS glial scar. *J Neurosci* 19: 10778-10788), and versican (Morven, C., et al., *Cell Tissue Res* (2001) 305: 267-273) (Genbank Ac. Nos. NM\_021948 (protein NP\_068767), NM\_004386 (protein NP\_004377)) (McKerracher, L. and Ellezam, B. (2002) Putting the brakes on regeneration. *Science* 296, 1819-20; McKerracher, L. and Winton, MJ (2002) Nogo on the go. *Neuron* 36, 345-8).

30 As the roles of each factor become evident, ligands more compatible with respective neurodegenerative disorders are selected, and antibodies against that factor may be able to be applied to specific neurodegenerative diseases.

For example, when considering the therapeutic application of 35 paramyxoviral vectors carrying these antibody genes to spinal cord injuries, methods for administering the vectors directly to lesion

sites can be used. Further, since vector expression levels are extremely high, their administration into the spinal cord cavity near a lesion site is also presumed possible. Further, after an axon is modified by injury, it takes several days to enter the regeneration phase, and thus there can be some time before deciding on administration. In addition, since an inflammatory reaction accompanying modification is actively generated right after injury, there is a high possibility that the viral vector will in fact be administered several days after injury, specifically three to ten days after injury. Furthermore, it is also possible to consider using a vector that carries not only a gene of a neutralizing antibody against a factor comprising axonal outgrowth inhibitory activity, but also a gene of a factor actively promoting the axonal outgrowth, proteins, or compounds comprising similar activities. Neurotrophic factors such as glial cell-derived neurotrophic factor (GDNF) may be cited as axonal outgrowth promoters.

The present invention also relates to paramyxoviral vectors encoding polypeptides that comprise variable regions of antibodies that suppress immune reactions. The present inventors discovered that the antigenic properties intrinsic to a vector itself could be attenuated by carrying in the vector the gene of an antibody that suppresses immune reaction. For example, by using a vector that expresses an antibody against a immune cell co-stimulator, or an antibody against a receptor thereof, it becomes possible to suppress the signal transduction due to that costimulator, thus suppressing immune system activation and achieving the long-term expression of genes carried in the vector. Such modified vectors are particularly useful as vectors for gene transfer into the living body. Target molecules to be inhibited by the antibodies include any desired signal molecules that transmit immunoactivation signals, and may be humoral factors such as growth factors or cytokines, or receptors thereof.

The mechanisms protecting living bodies from viruses are known to be complicated and multiplex. This important system is essential from the aspect of protection of the living body, but best avoided when considering gene therapy using viral vectors. One such mechanism is the activation of interferon regulatory factor 3, which is reported to be activated by a double-stranded RNA produced depending on an

RNA virus infection (IRF-3: Lin, R. et al., Mol. Cell. Biol. 18(5) 2986-2996 (1998); Heylbroeck, C. et al., J. Virol. 74(8) 3781-3792 (2000), Genbank Ac. No. NM\_001571 (protein NP\_001562)), double-stranded RNA-activated protein kinase (PKR: Der, S.D. & Lau, A.S. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 92, 8841-8845 (1995); Dejucq, N. et al., J. Cell. Biol. 139(4) 865-873 (1997), Genbank Ac. No. AH008429 (protein AAF13156)), and so on, activating downstream transcription factors to accelerate the expression of interferon (IFN) and the like. For example, by loading a vector with a gene of an antibody that suppresses the activity of IRF-3 or PKR, in a form that functions in cells, such as an intrabody, it is possible to partially suppress the natural immune reaction, enabling continuous expression of the carried gene due to the continuing infection. In fact, it has been demonstrated that continuous infection of the encephalomyocarditis virus occurs, at least at the *in vitro* level, in cells that express high levels of the antisense of PKR to suppress PKR activity (Yeung, M.C. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 96(21) 11860-11865 (1999)). Further, TLR-3 in the Toll-like receptor (TLR) family has been demonstrated to recognize double-stranded RNA, inducing natural immunity due to the viral infection (Alexopoulou, L. et al., Nature 413, 732-738 (2001)). TLR-4 has been also shown to participate in the same immunity induction by respiratory syncytial virus infection (Haynes, L.M. et al., J. Virol. 75(22) 10730-10737 (2001)). There is a possibility that neutralizing antibodies against TLR-3 or TLR-4 (TLR-3: Genbank Ac. No. NM\_003265 (protein NP\_003256); TLR-4: Genbank Ac. No. AH009665 (protein AAF89753)) also contributes to the continuous expression of genes by viral vectors.

Similarly, it is also possible to apply methods which have been tried in organ transplantation, aimed at attenuating the immunogenic properties of viral vectors, that is, carrying an antibody gene in a vector with the aim of peripheral immune tolerance. The following model for T cell activation has been proposed (Schwartz, R.H. et al., Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 2, 605-610 (1989)): The activation of resting phase T cells requires signals from a T cell receptor (TCR), an antigen, and a major histocompatibility complex (MHC), and also requires a secondary co-stimulatory signal. When

antigen stimulation occurs in conditions lacking the secondary signal, immune tolerance is induced due to T cell inactivation. If immune tolerance could be induced in viral vector-infected cells in this manner, the immune reaction towards that viral vector could be avoided, without suppressing other immune reactions. Such a method could be ideal. CD28 has been identified as a T cell co-stimulator (Ac. No. J02988 (protein AAA60581), AF222341 (AAF33792), AF222342 (AAF33793), and AF222343 (AAF33794)), and interacts with CD80 (Ac. No. NM\_005191 (NP\_005182)) and CD86 (Ac. No. U04343 (AAB03814), NM\_006889 (NP\_008820)) on the antigen-presenting cells to amplify stimulation by TCR, and further activates T cells by producing IL-2 and the like. On the other hand, CTLA-4 (cytotoxic T lymphocyte antigen 4: CD152) (Ac. No. L15006, (AAB59385)) binds with ligands (CD80, CD86) common to CD28 with a high level affinity, and acts to suppress T cells (Walunas, T.L. et al., *Immunity* 1(5) 405-413 (1994)). PD-1L and its receptor PD-1 are known as similar activating ligands (PD-1: Genbank Ac. No. U64863 (protein AAC51773), PD-1L: AF233516 (protein AAG18508; in the present description they are generally referred to as PD-1)) (Finger, L.R. et al., *Gene* 197, 177-187 (1997); Freeman, G.J. et al., *J. Exp. Med.* 192, 1027-1034 (2000)). Further, Lymphocyte Function-associated Antigen-1 (LFA-1) (Ac. No. Y00057 (CAA68266)) on T cells has been said to bind to Intercellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1: CD54) (Ac. No. J03132 (AAA52709), X06990 (CAA30051)) present on antigen-presenting cells, similarly participating in co-stimulation. From the above, a viral vector carrying the gene of an antibody that suppresses CD28, that of an antibody that mimics CTLA-4 activity, and/or that of an antibody that inhibits binding between LFA-1 and ICAM-1, is expected to possibly enable the infected cells to acquire peripheral immune tolerance, and to achieve long-term gene expression or multiple administrations. Actually, investigations of organ transplantation cases have proved that immune tolerance can be induced by the short-term administration of a corresponding antibody. For example, there have been many reports such as those on the effect of using an anti-CD28 antibody that inhibits the binding of co-stimulator CD28 (Yu, X.Z. et al., *J. Immunol.* 164(9) 4564-4568 (2000); Laskowski, I.A. et al., *J. Am. Soc. Nephrol.* 13(2)

519-527 (2002)), and alternatively, the effect of using a protein (CTLA4-Ig) in which CTLA-4, which functions to suppress T cell activation, is itself linked to IgG1-Fc (Pearson, T.C. et al., Transplantation 57(12) 1701-1706 (1994); Blazzer, B.R. et al., Blood 85(9) 2607-2618 (1995); Hakim, F.T. et al., J. Immunol. 155(4) 1757-1766 (1995); Gainer, A.L. et al., Transplantation 63(7) 1017-1021 (1997); Kirk, A.D. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94(16) 8789-8794 (1997); Comoli, P. et al., Bone Marrow Transplant 27(12) 1263-1273 (2001)), and the effect of using an antibody that inhibits the binding between LFA-1 and ICAM-1 (Heagy, W. et al., Transplantation 37(5) 520-523 (1984); Fischer, A. et al., Blood 77(2) 249-256 (1991); Guerette, B. et al., J. Immunol. 159(5) 2522-2531 (1997); Nicolls, M.R. et al., J. Immunol. 164(7) 3627-3634 (2000); Poston, R.S. et al., Transplantation 69(10) 2005-2013 (2000); Morikawa, M. et al., Transplantation 71(11) 1616-1621 (2001); Da Silva, M. et al., J. Urol. 166(5) 1915-1919 (2001)). Furthermore, using recently identified inducible costimulators, which are structurally and functionally homologous to CD28 and CTLA-4 (ICOS: Wallin, J.J. et al., J. Immunol. 167(1) 132-139 (2001); Sperling, A.I. & Bluestone, J.A. Nat. Immunol. 2(7) 573-574 (2001); Ozkaynak, E. et al., Nat. Immunol. 2(7) 591-596 (2001); Ac. No. AJ277832 (CAC06612)), similar investigations were performed to confirm the effect of anti-ICOS antibody (Ogawa, S. et al., J. Immunol. 167(10) 5741-5748 (2001); Guo, L. et al., Transplantation 73(7) 1027-1032 (2002)). Methods utilizing viral vectors have been reported, and the application of an adenoviral vector carrying a CTLA4-Ig gene at the time of organ transplantation has been investigated (Pearson, T.C. et al., Transplantation 57(12) 1701-1706 (1994); Li, T.S. et al., Transplantation 72(12) 1983-1985 (2001)).

30 The above-described methods aiming at peripheral immune tolerance at the scene of organ transplantation can also be applied as is, as effective methods for inducing immune tolerance when utilizing viral vectors for gene transfer. Thus, long-term gene expression or repeated administrations can be realized by carrying 35 a corresponding antibody gene (or CTLA4-Ig) in a viral vector. In this respect, reports on adenoviral vectors have demonstrated that

the simultaneous administration of an adenoviral vector carrying the CTLA4-Ig gene along with a vector carrying a different marker gene (*lacZ*) will suppress immune reaction and prolong marker gene expression, (Ali, R.R. et al., Gene Ther. 5(11) 1561-1565 (1998);  
5 Ideguchi, M. et al., Neuroscience 95(1) 217-226 (2000); Uchida, T. et al., Brain Res. 898(2) 272-280 (2001)). In this simple system, immune tolerance was examined by using only the CTLA4-Ig gene, and carrying the marker gene in a different vector. There were no reports of examples of: carrying both genes in the same vector, suppressing  
10 another co-stimulator with an antibody gene, or investigating the effect of the paramyxoviral vector in particular, and no detailed examinations at all. In the present invention, genes of antibodies against various signal molecules, as described above, may be used. Furthermore, a number of genes such as antibody genes that induce  
15 immune tolerance, and therapeutic genes (or marker genes), can be expressed from a single vector. In particular, by using an antibody gene to suppress the action of a co-stimulator for T cell activation, it is possible, for example, to construct a vector that allows the long-term expression of a gene which acts on the immune system,  
20 restricted to a local administration site, and to administer repeatedly (multiple times).

Paramyxoviral vectors carrying antibody genes against these factors or receptors can be used as therapeutic vectors also carrying therapeutic genes. Alternatively, administration of such a  
25 paramyxoviral vector along with another vector that carries a therapeutic gene will enable long-term expression of the therapeutic gene and/or repeated administrations. Any disease may be cited as a possible gene therapy target. Treatment methods that comply with gene therapies using each of the therapeutic genes may be applied  
30 as methods for administering the vector and the like.

Vectors of this invention encoding an antibody that induces immune tolerance have elevated post-administration durability of gene expression in the living body, compared to a control vector not encoding this antibody. Gene expression durability can be assessed, for  
35 example, by administering a vector of this invention, and a control vector, with the same titer to the same site (for example, to

symmetrical sites) to measure time-dependent variations in relative expression level, with the level right after administration taken as 100. For example, the time required after administration until the relative expression level decreases to 50, 30, or 10; or the relative expression level after a predetermined time, may be measured. The durability of expression level of a vector of this invention is statistically significantly elevated compared to a control (for example, significant at a significance level of 5% or more). Statistical analyses can be performed, for example, using t tests.

Further, at this time, by administering an antibody against a signal molecule of a costimulatory signal, or CTLA-4 or a fragment thereof, the durability of gene expression from the vector can be further prolonged. Antibodies against the above-described CD28, CD80, CD86, LFA-1, ICAM-1 (CD54), ICOS, or the like can be used as antibodies against a signal molecule of a costimulatory signal. Such antibody fragments can be prepared, for example, according to "Japanese Biochemical Society, ed., New Biochemical Experiment Manual 12, Molecular Immunology III, pp 185-195 (Tokyo Kagaku Dojin)" and/or "Current Protocols in Immunology, Volume 1, (John Wiley & Sons, Inc.)". Antibody fragments can be obtained, for example, by digesting an antibody with a proteolytic enzyme, such as pepsin, papain, and trypsin. Alternatively, it is possible to prepare these fragments by analyzing the amino acid sequences of the variable regions, and expressing the sequences as recombinant proteins. Antibodies also include humanized and human antibodies. Antibodies can be purified by affinity chromatography using a protein A column, protein G column, or the like. Any desired polypeptides can be used as CTLA-4 or fragments thereof, so long as they comprise the CD80/CD86 binding site of CTLA-4, and bind to CD80 and/or CD86 to inhibit interaction with CD28; however, for example, a soluble polypeptide in which an Fc fragment of IgG (for example, IgG1) is fused to the extracellular domain of CTLA-4 can be preferably used. These polypeptides and antibodies can be formed into pharmaceutical preparations by lyophilization, or made into aqueous compositions along with a desired pharmaceutically acceptable carrier, specifically physiological saline or phosphate-buffered physiological saline (PBS), and the like. The

present invention relates to gene transduction kits comprising these polypeptides or antibodies, and vectors of this invention. The kits can be used for prolonging the duration of expression after administration of the vectors, particularly for increasing the 5 durability of gene expression from repeatedly administered vectors.

To prepare a vector of the present invention, a cDNA encoding a genomic RNA of a paramyxovirus of this invention is transcribed in mammalian cells, in the presence of viral proteins (i.e., N, P, and L proteins) essential for reconstitution of an RNP, which comprises 10 a genomic RNA of a paramyxovirus. Viral RNP can be reconstituted by producing either the negative strand genome (that is, the same antisense strand as the viral genome) or the positive strand (the sense strand encoding the viral proteins). Production of the positive strand is preferable for increased efficiency of vector reconstitution. 15 The RNA terminals preferably reflect the terminals of the 3'-leader sequence and 5'-trailer sequence as accurately as possible, as in the natural viral genome. To accurately regulate the 5'-end of the transcript, for example, the RNA polymerase may be expressed within 20 a cell using the recognition sequence of T7 RNA polymerase as a transcription initiation site. To regulate the 3'-end of the transcript, for example, an autocleavage-type ribozyme can be encoded at the 3'-end of the transcript, allowing accurate cleavage of the 3'-end with this ribozyme (Hasan, M. K. et al., J. Gen. Virol. 78: 2813-2820, 1997; Kato, A. et al., 1997, EMBO J. 16: 578-587; and Yu, 25 D. et al., 1997, Genes Cells 2: 457-466).

For example, a recombinant Sendai virus vector carrying a foreign gene can be constructed as follows, according to descriptions in: Hasan, M. K. et al., J. Gen. Virol. 78: 2813-2820, 1997; Kato, A. et al., 1997, EMBO J. 16: 578-587; Yu, D. et al., 1997, Genes Cells 30 2: 457-466; or the like.

First, a DNA sample comprising a cDNA sequence of an objective foreign gene is prepared. The DNA sample is preferably one that can be confirmed to be a single plasmid by electrophoresis at a concentration of not less than 25 ng/ $\mu$ l. The following explains a 35 case of using a NotI site to insert a foreign gene into a DNA encoding a viral genomic RNA, with reference to examples. When a NotI

recognition site is included in a target cDNA nucleotide sequence, the base sequence is altered using site-directed mutagenesis or the like, such that the encoded amino acid sequence does not change, and the NotI site is preferably excised in advance. The objective gene fragment is amplified from this sample by PCR, and then recovered. By adding the NotI site to the 5' regions of a pair of primers, both ends of the amplified fragments become NotI sites. E-I-S sequences, or parts thereof, are included in primers such that, after a foreign gene is inserted into the viral genome, one E-I-S sequence each is placed between the ORF of the foreign gene, and either side of the ORFs of the viral genes.

For example, to guarantee cleavage with NotI, the forward side synthetic DNA sequence has a form in which any desired sequence of not less than two nucleotides (preferably four nucleotides not comprising a sequence derived from the NotI recognition site, such as GCG and GCC, and more preferably ACTT) is selected at the 5'-side, and a NotI recognition site gcggccgc is added to its 3'-side. To that 3'-side, nine arbitrary nucleotides, or nine plus a multiple of six nucleotides are further added as a spacer sequence. To the further 3' of this, a sequence corresponding to about 25 nucleotides of the ORF of a desired cDNA, including and counted from the initiation codon ATG, is added. The 3'-end of the forward side synthetic oligo DNA is preferably about 25 nucleotides, selected from the desired cDNA such that the final nucleotide becomes a G or C.

For the reverse side synthetic DNA sequence, no less than two arbitrary nucleotides (preferably four nucleotides not comprising a sequence derived from a NotI recognition site, such as GCG and GCC, and more preferably ACTT) are selected from the 5'-side, a NotI recognition site 'gcggccgc' is added to its 3'-side, and to that 3' is further added an oligo DNA insert fragment for adjusting the length. The length of this oligo DNA is designed such that the chain length of the NotI fragment of the final PCR-amplified product, comprising the added E-I-S sequences, will become a multiple of six nucleotides (the so-called "rule of six"); Kolakofski, D., et al., J. Virol. 72:891-899, 1998; Calain, P. and Roux, L., J. Virol. 67:4822-4830, 1993; Calain, P. and Roux, L., J. Virol. 67: 4822-4830, 1993). When

adding an E-I-S sequence to this primer, to the 3'-side of the oligo DNA insertion fragment is added: the complementary strand sequence of the Sendai virus S sequence, preferably 5'-CTTCACCCCT-3' (SEQ ID NO: 1); the complementary strand sequence of the I sequence, preferably 5'-AAG-3'; the complementary strand sequence of the E sequence, preferably 5'-TTTTCTTACTACGG-3' (SEQ ID NO: 2); and further to this 3'-side is added a complementary strand sequence corresponding to about 25 nucleotides, counted backwards from the termination codon of a desired cDNA sequence, whose length has been selected such that 10 the final nucleotide of the chain becomes a G or C, to make the 3'-end of the reverse side synthetic DNA.

PCR can be performed by usual methods using Taq polymerase or other DNA polymerases. Objective amplified fragments are digested with NotI, and then inserted in to the NotI site of plasmid vectors 15 such as pBluescript. The nucleotide sequences of PCR products thus obtained are confirmed with a sequencer, and plasmids comprising the correct sequence are selected. The inserted fragment is excised from these plasmids using NotI, and cloned into the NotI site of a plasmid comprising genomic cDNA. A recombinant Sendai virus cDNA can also 20 be obtained by inserting the fragment directly into the NotI site, without using a plasmid vector.

For example, a recombinant Sendai virus genomic cDNA can be constructed according to methods described in the literature (Yu, D. et al., Genes Cells 2: 457-466, 1997; Hasan, M. K. et al., J. Gen. 25 Virol. 78: 2813-2820, 1997): For example, an 18 bp spacer sequence (5'-(G)-CGGCCGCAGATCTTCACG-3') (SEQ ID NO: 3), comprising a NotI restriction site, is inserted between the leader sequence and the ORF of N protein of the cloned Sendai virus genomic cDNA (pSeV(+)), obtaining plasmid pSeV18<sup>b</sup>(+), which comprises an auto-cleavage 30 ribozyme site derived from the antigenomic strand of delta hepatitis virus (Hasan, M. K. et al., 1997, J. General Virology 78: 2813-2820). A recombinant Sendai virus cDNA comprising a desired foreign gene can be obtained by inserting a foreign gene fragment into the NotI site of pSeV18<sup>b</sup>(+).

35 A vector of this invention can be reconstituted by transcribing a DNA encoding a genomic RNA of a recombinant paramyxovirus thus

prepared, in cells in the presence of the above-described viral proteins (L, P, and N). The present invention provides DNAs encoding the viral genomic RNAs of the vectors of this invention, for manufacturing the vectors of this invention. This invention also relates to the use of DNAs encoding the genomic RNAs of the vectors, for their application to the manufacture of the vectors of this invention. The recombinant viruses can be reconstituted by methods known in the art (WO97/16539; WO97/16538; Durbin, A. P. et al., 1997, *Virology* 235: 323-332; Whelan, S. P. et al., 1995, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 8388-8392; Schnell, M. J. et al., 1994, *EMBO J.* 13: 4195-4203; Radecke, F. et al., 1995, *EMBO J.* 14: 5773-5784; Lawson, N. D. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 4477-4481; Garcin, D. et al., 1995, *EMBO J.* 14: 6087-6094; Kato, A. et al., 1996, *Genes Cells* 1: 569-579; Baron, M. D. and Barrett, T., 1997, *J. Virol.* 71: 1265-1271; Bridgen, A. and Elliott, R. M., 1996, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 15400-15404). With these methods, minus strand RNA viruses including parainfluenza virus, vesicular stomatitis virus, rabies virus, measles virus, rinderpest virus, and Sendai virus can be reconstituted from DNA. The vectors of this invention can be reconstituted according to these methods. When a viral vector DNA is made F gene, HN gene, and/or M gene deficient, such DNAs do not form infectious virions as is. However, by separately introducing host cells with these lacking genes, and/or genes encoding the envelope proteins of other viruses, and then expressing these genes therein, it is possible to form infectious virions.

Specifically, the viruses can be prepared by the steps of: (a) transcribing cDNAs encoding paramyxovirus genomic RNAs (negative strand RNAs), or complementary strands thereof (positive strands), in cells expressing N, P, and L proteins; and (b) harvesting complexes that comprise the genomic RNAs from these cells, or from culture supernatants thereof. For transcription, a DNA encoding a genomic RNA is linked downstream of an appropriate promoter. The genomic RNA thus transcribed is replicated in the presence of N, L, and P proteins to form an RNP complex. Then, in the presence of M, HN, and F proteins, virions enclosed in an envelope are formed. For example, a DNA encoding a genomic RNA can be linked downstream of a T7 promoter, and transcribed

to RNA by T7 RNA polymerase. Any desired promoter, other than those comprising a T7 polymerase recognition sequence, can be used as a promoter. Alternatively, RNA transcribed *in vitro* may be transfected into cells.

5 Enzymes essential for the initial transcription of genomic RNA from DNA, such as T7 RNA polymerase, can be supplied by transducing the plasmid vectors or viral vectors that express them, or, for example, by incorporating a gene thereof into a chromosome of the cell so as to enable induction of their expression, and then inducing expression 10 at the time of viral reconstitution. Further, genomic RNA and viral proteins essential for vector reconstitution are supplied, for example, by transducing the plasmids that express them. In supplying these viral proteins, helper viruses such as wild type or certain types 15 of mutant paramyxovirus can be used, but this may induce contamination of these viruses, and hence is not preferred.

Methods for transducing DNAs expressing the genomic RNAs into cells include, for example, (i) methods for making DNA precipitates which target cells can internalize; (ii) methods for making complexes comprising DNAs suitable for internalization by target cells, and 20 comprising positive charge characteristics with low cytotoxicity; and (iii) methods for using electric pulses to instantaneously bore pores in the target cell membrane, of sufficient size for DNA molecules to pass through.

For (ii), various transfection reagents can be used. For example, 25 DOTMA (Roche), Superfect (QIAGEN #301305), DOTAP, DOPE, DOSPER (Roche #1811169), and such can be cited. As (i), for example, transfection methods using calcium phosphate can be cited, and although DNAs transferred into cells by this method are internalized by phagosomes, a sufficient amount of DNA is known to enter the nucleus (Graham, 30 F. L. and Van Der Eb, J., 1973, *Virology* 52: 456; Wigler, M. and Silverstein, S., 1977, *Cell* 11: 223). Chen and Okayama investigated the optimization of transfection techniques, reporting that (1) incubation conditions for cells and coprecipitates are 2 to 4% CO<sub>2</sub>, 35°C, and 35 15 to 24 hours, (2) the activity of circular DNA is higher than linear DNA, and (3) optimal precipitation is obtained when the DNA concentration in the precipitate mixture is 20 to 30 µg/ml (Chen,

C. and Okayama, H., 1987, Mol. Cell. Biol. 7: 2745). The methods of (ii) are suitable for transient transfections. Methods for performing transfection by preparing a DEAE-dextran (Sigma #D-9885 M.W. 5x 10<sup>5</sup>) mixture with a desired DNA concentration ratio have been known for a while. Since most complexes are decomposed in endosomes, chloroquine may also be added to enhance the effect (Calos, M. P., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 3015). The methods of (iii) are referred to as electroporation methods, and are in more general use than methods (i) and (ii) because they are not cell selective. The efficiency of these methods is supposed to be good under optimal conditions for: the duration of pulse electric current, shape of the pulse, potency of electric field (gap between electrodes, voltage), conductivity of buffer, DNA concentration, and cell density.

Of the above three categories, the methods of (ii) are simple to operate and can examine many samples using a large amount of cells, and thus transfection reagents are suitable for the transduction into cells of DNA for vector reconstitution. Preferably, Superfect Transfection Reagent (QIAGEN, Cat No. 301305), or DOSPER Liposomal Transfection Reagent (Roche, Cat No. 1811169) is used, but transfection reagents are not limited to these.

Specifically, virus reconstitution from cDNA can be carried out, for example, as follows:

In a plastic plate of about 24- to 6-wells, or a 100-mm Petri dish or the like, LLC-MK2 cells derived from simian kidney are cultured till near 100% confluent, using minimum essential medium (MEM) comprising 10% fetal calf serum (FCS) and antibiotics (100 units/ml penicillin G and 100 µg/ml streptomycin), and infected with, for example, 2 PFU/cell of the recombinant vaccinia virus vTF7-3, which expresses T7 RNA polymerase and has been inactivated by 20-minutes of UV irradiation in the presence of 1 µg/ml psoralen (Fuerst, T. R. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 8122-8126, 1986; Kato, A. et al., Genes Cells 1: 569-579, 1996). The amount of psoralen added and the UV irradiation time can be appropriately adjusted. One hour after infection, 2 to 60 µg, and more preferably 3 to 20 µg, of DNA encoding the genomic RNA of a recombinant Sendai virus is transfected along with the plasmids expressing trans-acting viral proteins

essential for viral RNP production (0.5 to 24 µg of pGEM-N, 0.25 to 12 µg of pGEM-P, and 0.5 to 24 µg of pGEM-L) (Kato, A. et al., Genes Cells 1: 569-579, 1996), using the lipofection method or such with Superfect (QIAGEN). The ratio of the amounts of expression vectors 5 encoding the N, P, and L proteins is preferably 2:1:2; and the plasmid amounts are appropriately adjusted, for example, in the range of 1 to 4 µg of pGEM-N, 0.5 to 2 µg of pGEM-P, and 1 to 4 µg of pGEM-L.

The transfected cells are cultured, as occasion may demand, in serum-free MEM comprising 100 µg/ml of rifampicin (Sigma) and cytosine 10 arabinoside (AraC), more preferably only 40 µg/ml of cytosine arabinoside (AraC) (Sigma). Optimal drug concentrations are set so as to minimize cytotoxicity due to the vaccinia virus, and to maximize virus recovery rate (Kato, A. et al., 1996, Genes Cells 1: 569-579). After culturing for about 48 to 72 hours after transfection, cells 15 are harvested, and then disintegrated by repeating freeze-thawing three times. The disintegrated materials comprising RNP are re-infected to LLC-MK2 cells, and the cells are cultured. Alternatively, the culture supernatant is recovered, added to a culture solution of LLC-MK2 cells to infect them, and then cultured. 20 Transfection can be conducted by, for example, forming a complex with lipofectamine, polycationic liposome, or the like, and transducing the complex into cells. Specifically, various transfection reagents can be used. For example, DOTMA (Roché), Superfect (QIAGEN #301305), DOTAP, DOPE, and DOSPER (Roche #1811169) may be cited. In order to 25 prevent decomposition in the endosome, chloroquine may also be added (Calos, M. P., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 3015). In cells transduced with RNP, viral gene expression from RNP and RNP replication progress, and the vector is amplified. By diluting the viral solution thus obtained (for example, 10<sup>6</sup>-fold), and then repeating the 30 amplification, the vaccinia virus vTF7-3 can be completely eliminated. Amplification is repeated, for example, three or more times. Vectors thus obtained can be stored at -80°C. In order to reconstitute a viral vector without transmissibility, which is defective in a gene encoding an envelope protein, LLC-MK2 cells expressing the envelope protein 35 may be used for transfection, or a plasmid expressing the envelope protein may be cotransfected. Alternatively, a defective type viral

vector can be amplified by culturing the transfected cells overlaid with LLK-MK2 cells expressing the envelope protein (see WO00/70055 and WO00/70070).

Titers of viruses thus recovered can be determined, for example, by measuring CIU (Cell-Infected Unit) or hemagglutination activity (HA) (WO00/70070; Kato, A. et al., 1996, Genes Cells 1: 569-579; Yonemitsu, Y. & Kaneda, Y., Hemaggulutinating virus of Japan-liposome-mediated gene delivery to vascular cells. Ed. by Baker AH. Molecular Biology of Vascular Diseases. Method in Molecular Medicine: Humana Press: pp. 295-306, 1999). Titers of vectors carrying GFP (green fluorescent protein) marker genes and the like can be quantified by directly counting infected cells, using the marker as an indicator (for example, as GFP-CIU). Titers thus measured can be handled in the same way as CIU (WO00/70070).

As long as a viral vector can be reconstituted, the host cells used in the reconstitution are not particularly limited. For example, in the reconstitution of Sendai viral vectors and such, cultured cells such as LLC-MK2 cells and CV-1 cells derived from monkey kidney, BHK cells derived from hamster kidney, and cells derived from humans can be used. By expressing suitable envelope proteins in these cells, infectious virions comprising these proteins in the envelope can also be obtained. Further, to obtain a large quantity of a Sendai viral vector, a viral vector obtained from an above-described host can be infected to embrionated hen eggs, to amplify the vector. Methods for manufacturing viral vectors using hen eggs have already been developed (Nakanishi, et al., ed. (1993), "State-of-the-Art Technology Protocol in Neuroscience Research III, Molecular Neuron Physiology", Koseisha, Osaka, pp. 153-172). Specifically, for example, a fertilized egg is placed in an incubator, and cultured for nine to twelve days at 37 to 38°C to grow an embryo. After the viral vector is inoculated into the allantoic cavity, the egg is cultured for several days (for example, three days) to proliferate the viral vector. Conditions such as the period of culture may vary depending upon the recombinant Sendai virus being used. Then, allantoic fluids comprising the vector are recovered. Separation and purification of a Sendai viral vector from allantoic fluids can be performed according to a usual method (Tashiro,

M., "Virus Experiment Protocol," Nagai, Ishihama, ed., Medical View Co., Ltd., pp. 68-73, (1995)).

For example, the construction and preparation of Sendai virus vectors defective in F gene can be performed as described below (see 5 WO00/70055 and WO00/70070):

<1> Construction of a genomic cDNA of an F-gene defective Sendai virus, and a plasmid expressing F gene

A full-length genomic cDNA of Sendai virus (SeV), the cDNA of pSeV18<sup>+</sup> b(+) (Hasan, M. K. et al., 1997, J. General Virology 78: 10

2813-2820) ("pSeV18<sup>+</sup> b(+)" is also referred to as "pSeV18<sup>+</sup>"), is digested with SphI/KpnI to recover a fragment (14673 bp), which is cloned into pUC18 to prepare plasmid pUC18/KS. Construction of an F gene-defective site is performed on this pUC18/KS. An F gene deficiency is created by a combination of PCR-ligation methods, and, 15 as a result, the F gene ORF (ATG-TGA = 1698 bp) is removed. Then, for example, atgcatgccggcagatga (SEQ ID NO: 4) is ligated to construct an F gene-defective type SeV genomic cDNA (pSeV18<sup>+</sup>/ΔF). A PCR product formed in PCR by using the pair of primers [forward: 20 5'-gtttagtactgcaagagc/SEQ ID NO: 5, reverse: 5'-tttgcggcatgcattttccaaggggagatggcaacc/SEQ ID NO: 6] is connected upstream of F, and a PCR product formed using the pair of primers [forward: 5'-atgcattgcggcagatga/SEQ ID NO: 7, reverse: 5'-tgggtgaatgagagaatcagc/SEQ ID NO: 8] is connected downstream of F gene at EcoT22I. The plasmid thus obtained is digested with SacI and SalI to recover a 4931 bp fragment of the region comprising the 25 F gene-defective site, which is cloned into pUC18 to form pUC18/dFSS. This pUC18/dFSS is digested with DraIII, the fragment is recovered, replaced with the DraIII fragment of the region comprising the F gene of pSeV18<sup>+</sup>, and ligated to obtain the plasmid pSeV18<sup>+</sup>/ΔF.

30 A foreign gene is inserted, for example, into the NsiI and NgoMIV restriction enzyme sites in the F gene-defective site of pUC18/dFSS. For this, a foreign gene fragment may be, for example, amplified using an NsiI-tailed primer and an NgoMIV-tailed primer.

<2> Preparation of helper cells that induce SeV-F protein expression

35 To construct an expression plasmid of the Cre/loxP induction type that expresses the Sendai virus F gene (SeV-F), the SeV-F gene

is amplified by PCR, and inserted to the unique *Swa*I site of the plasmid pCALNdLw (Arai, T. et al., J. Virology 72, 1998, p1115-1121), which is designed to enable the inducible expression of a gene product by Cre DNA recombinase, thus constructing the plasmid pCALNdLw/F.

To recover infectious virions from the F gene-defective genome, a helper cell line expressing SeV-F protein is established. The monkey kidney-derived LLC-MK2 cell line, which is commonly used for SeV proliferation, can be used as the cells, for example. LLC-MK2 cells are cultured in MEM supplemented with 10% heat-treated inactivated fetal bovine serum (FBS), penicillin G sodium (50 units/ml), and streptomycin (50 µg/ml) at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>. Since the SeV-F gene product is cytotoxic, the above-described plasmid pCALNdLw/F, which was designed to enable inducible expression of the F gene product with Cre DNA recombinase, is transfected to LLC-MK2 cells for gene transduction by the calcium phosphate method (using a mammalian transfection kit (Stratagene)), according to protocols well known in the art.

The plasmid pCALNdLw/F (10 µg) is transduced into LLC-MK2 cells grown to 40% confluence using a 10-cm plate, and the cells are then cultured in MEM (10 ml) comprising 10% FBS, in a 5% CO<sub>2</sub> incubator at 37°C for 24 hours. After 24 hours, the cells are detached and suspended in the medium (10 ml). The suspension is then seeded onto five 10-cm dishes, 5 ml to one dish, 2 ml each to two dishes, and 0.2 ml each to two dishes, and cultured in MEM (10 ml) comprising G418 (GIBCO-BRL) (1200 µg/ml) and 10% FBS. The cells were cultured for 14 days, exchanging the medium every two days, to select cell lines stably transduced with the gene. The cells grown from the above medium that show the G418 resistance are recovered using a cloning ring. Culture of each clone thus recovered is continued in 10-cm plates until confluent.

After the cells have grown to confluence in a 6-cm dish, F protein expression is induced by infecting the cells with Adenovirus AxCANCre, for example, at MOI = 3, according to the method of Saito, et al. (Saito et al., Nucl. Acids Res. 23: 3816-3821 (1995); Arai, T. et al., J. Virol. 72, 1115-1121 (1998)).

<3> Reconstitution and amplification of F-gene defective Sendai virus

(SeV)

The above-described plasmid pSeV18<sup>+</sup>/ΔF, into which a foreign gene has been inserted, is transfected to LLC-MK2 cells as follows: LLC-MK2 cells are seeded at 5x 10<sup>6</sup> cells/dish in 100-mm dishes. When genomic RNA transcription is carried out with T7·RNA polymerase, cells are cultured for 24 hours, then infected at an MOI of about two for one hour at room temperature, with recombinant vaccinia virus expressing T7·RNA polymerase, which has been treated with psoralen and long-wave ultraviolet rays (365 nm) for 20 minutes (PLWUV-VacT7: 10 Fuerst, T. R. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 8122-8126 (1986)). For the ultraviolet ray irradiation of vaccinia virus, for example, an UV Stratalinker 2400 equipped with five 15-watt bulbs can be used (catalogue No. 400676 (100V), Stratagene, La Jolla, CA, USA). The cells are washed with serum-free MEM, then an appropriate lipofection 15 reagent is used to transfect the cells with a plasmid expressing the genomic RNA, and expression plasmids expressing the N, P, L, F, and HN proteins of Paramyxovirus respectively. The ratio of amounts of these plasmids can be preferably set as 6:2:1:2:2:2, in this order, though is not limited thereto. For example, a genomic RNA-expressing 20 plasmid as well as expression plasmids expressing the N, P, L, and F plus HN proteins (pGEM/NP, pGEM/P, pGEM/L, and pGEM/F-HN; WO00/70070, Kato, A. et al., Genes Cells 1, 569-579 (1996)) are transfected at an amount ratio of 12 μg, 12 μg, 4 μg, 2 μg, 4 μg, and 4 μg/dish, respectively. After culturing for several hours, the cells are twice 25 washed with serum-free MEM, and cultured in MEM comprising 40 μg/ml of cytosine β-D-arabinofuranoside (AraC: Sigma, St. Louis, MO) and 7.5 μg/ml of trypsin (Gibco-BRL, Rockville, MD). These cells are recovered, and the pellets are suspended in Opti-MEM (10<sup>7</sup> cells/ml). Suspensions are freeze-thawed three times, mixed with lipofection 30 reagent DOSPER (Boehringer Mannheim) (10<sup>6</sup> cells/25 μl DOSPER), stood at room temperature for 15 minutes, transfected to the above-described cloned F-expressing helper cells (10<sup>6</sup> cells/well in a 12-well-plate), and cultured in serum-free MEM (comprising 40 μg/ml AraC and 7.5 μg/ml trypsin) to recover the supernatant. Viruses defective in a gene other 35 than F, for example, the HN or M gene, can also be prepared by similar methods to this.

When a viral gene-defective type vector is prepared, for example, if two or more different kinds of vectors, that comprise the different viral genes which are defective in the viral genome in the vectors, are transduced into the same cell, the viral proteins that are defective in each of the vectors are supplied by their expression from the other vectors. Thus, together, these vectors make up for protein deficiencies, and infectious virions can be formed. As a result, the replication cycle can amplify the viral vectors. In other words, when two or more kinds of vectors of this invention are inoculated in a combination that together supplements deficient viral proteins, mixtures of viral vectors defective in each of the viral genes can be produced on a large scale and at a low cost. When compared to viruses that are not deficient in viral genes, these viruses have smaller genomes, due to deficient viral genes, and can thus carry larger foreign genes. Further, these viruses, which lack proliferative ability due to deficient viral genes, are extracellularly attenuated, and maintaining coinfection is difficult. They are therefore sterilized, which is an advantage in environmental release management. For example, it is conceivable that a vector encoding an antibody H chain, and one encoding an L chain, are separately constructed so as to be able to complement each other, and are then co-infected. This invention provides compositions comprising a paramyxoviral vector encoding a polypeptide that comprises an antibody H chain variable region, and a paramyxoviral vector encoding a polypeptide that comprises an antibody L chain variable region. Further, this invention provides kits comprising a paramyxoviral vector encoding a polypeptide that comprises an antibody H chain variable region, and a paramyxoviral vector encoding a polypeptide that comprises an antibody L chain variable region. These compositions and kits can be used to form antibodies comprising H and L chains by simultaneous infection.

When, after administering a transmissible paramyxoviral vector to an individual or cell, the proliferation of the viral vector must be restrained due to treatment completion and such, it is also possible to specifically restrain only the proliferation of the viral vector, with no damage to the host, by administering an RNA-dependent RNA

polymerase inhibitor.

According to the methods of the present invention, the viral vectors of this invention can be released into the culture medium of virus-producing cells, for example, at a titer of  $1 \times 10^5$  CIU/ml or more, preferably  $1 \times 10^6$  CIU/ml or more, more preferably  $5 \times 10^6$  CIU/ml or more, more preferably  $1 \times 10^7$  CIU/ml or more, more preferably  $5 \times 10^7$  CIU/ml or more, more preferably  $1 \times 10^8$  CIU/ml or more, and more preferably  $5 \times 10^8$  CIU/ml or more. Viral titers can be measured by a method described in this description and others (Kiyotani, K. et al., *Virology* 177(1), 65-74 (1990); WO00/70070).

The recovered paramyxoviral vectors can be purified to become substantially pure. Purification can be performed by purification and separation methods known in the art, including filtration, centrifugal separation, and column purification, or any combinations thereof. "Substantially pure" means that a viral vector accounts for a major proportion of a sample in which the viral vector exists as a component. Typically, a substantially pure viral vector can be identified by confirming that the proportion of proteins derived from the viral vector is 10% or more of all of the proteins in a sample, preferably 20% or more, more preferably 50% or more, preferably 70% or more, more preferably 80% or more, and further more preferably 90% or more (excluding, however, proteins added as carriers and stabilizers). Examples of specific methods for purifying paramyxoviruses are those that use cellulose sulfate ester or cross-linked polysaccharide sulfate ester (Examined Published Japanese Patent Application No. (JP-B) Sho 62-30752, JP-B Sho 62-33879, and JP-B Sho 62-30753), and those for methods for adsorbing them to polysaccharides comprising fucose sulfate and/or degradation products thereof (WO97/32010).

In preparing compositions comprising a vector, the vector can be combined with a pharmaceutically acceptable desired carrier or vehicle, as necessary. "A pharmaceutically acceptable carrier or vehicle" means a material that can be administered together with the vector which does not significantly inhibit gene transduction via the vector. For example, a vector can be appropriately diluted with physiological saline or phosphate-buffered saline (PBS) to form a

composition. When a vector is grown in hen eggs or the like, the "pharmaceutically acceptable carrier or vehicle" may comprise allantoic fluids. Further, compositions comprising a vector may include carriers or vehicles such as deionized water and 5% dextrose aqueous solution. Furthermore, compositions may comprise, besides the above, plant oils, suspending agents, surfactants, stabilizers, biocides, and so on. The compositions can also comprise preservatives or other additives. The compositions comprising the vectors of this invention are useful as reagents and medicines.

10 Vector dose may vary depending upon the disorder, body weight, age, gender, and symptoms of patients, as well as purpose of administration, form of the composition to be administered, administration method, gene to be transduced, and so on; however, those skilled in the art can appropriately determine dosages.

15 Administration route can be appropriately selected, although administration can be performed, for example, percutaneously, intranasally, perbronchially, intramuscularly, intraperitoneally, intravenously, intra-articularly, intraspinally, or subcutaneously, but is not limited to these routes. Administration can also be performed locally or systemically. Doses of the vector are preferably administered in a pharmaceutically acceptable carrier in a range of preferably about  $10^5$  CIU/ml to about  $10^{11}$  CIU/ml, more preferably about  $10^7$  CIU/ml to about  $10^9$  CIU/ml, most preferably about  $1 \times 10^8$  CIU/ml to about  $5 \times 10^8$  CIU/ml. In humans, a single dose is preferably in the range of  $2 \times 10^5$  CIU to  $2 \times 10^{10}$  CIU, and can be administered once or more, so long as the side effects are within a clinically acceptable range. The same applies to the number of administrations per day.

20 In the case of a protein preparation produced using a vector of this invention, doses of the protein may be, for example, in the range of 10 ng/kg to 100  $\mu$ g/kg, preferably 100 ng/kg to 50  $\mu$ g/kg, more preferably 1  $\mu$ g/kg to 5  $\mu$ g/kg. With animals other than humans, for example, the above-described doses can be converted based on the body weight ratio or volume ratio of a target site for administration (e.g. average values) between the objective animal and humans, and the converted doses can be administered to the animals. Subjects for administering compositions comprising the vectors of this invention

include all mammals, such as humans, monkeys, mice, rats, rabbits, sheep, cattle, and dogs.

Brief Description of the Drawings

5 Fig. 1 represents the nucleotide sequence of a NotI fragment encoding a Fab (H and L chains), of a neutralizing antibody raised against NOGO. Protein-coding sequences are shown in capital letters. Further, nucleotide sequences of the SeV E signal, intervening sequence, and S signal are shown as an underline-dotted underline-  
10 underline. A wavy underline represents a site which develops the same cohesive end as NotI, and, using this sequence, the coding sequences of the H and L chains can be cloned into the NotI sites of separate vectors, for example.

15 Fig. 2 represents oligonucleotides used in constructing the fragment encoding Fab, which is shown in Fig. 1. SEQ ID NOS: 12 to 42 were assigned in this order to SYN80 F1 to SYN80 R16.

Fig. 3 is a schematic representation of configurations of the oligonucleotides shown in Fig. 2.

20 Fig. 4 represents schematic diagrams showing the structures of a transmissible-type virus (SeV18+IN-1) (panel A) and a transmission-deficient type virus (SeV18+IN-1/ΔF) (panel B), which are carrying the Fab gene of the NOGO-neutralizing antibody. It also shows photographs of RT-PCR confirmation of the viral genome.

25 Fig. 5 represents photographs showing Fab expression from a transmissible-type virus or a virus defective in the F gene, both carrying the Fab gene of the NOGO-neutralizing antibody. A transmissible-type SeV vector carrying the GFP gene was used as a negative control (NC). Antibody expressions two (d2) or four (d4) days after infection are shown.

30 Fig. 6 represents photographs showing the action of SeV carrying the IN-1 gene, against the activity of q-pool, which affects NIH-3T3 cell morphology. Micrographs of NIH-3T3 cells three days after culture initiation (two days after SeV infection) are shown for each of the conditions. (A) using a plate untreated with q-pool; (B) using a plate treated with q-pool; (C) using a plate treated with q-pool and cells infected with SeV18+GFP at MOI = 1; (D) a GFP fluorescent

photograph taken in the same visual field as that of (C), and superimposed on (C) (an indicator of the ratio of SeV-infected cells); and (E) using a plate treated with q-pool and cells infected with SeV18+IN1 at MOI = 1.

Fig. 7 shows the action of SeV carrying the IN-1 gene on the proliferation of NIH-3T3 cells. Cell number ratios of NIH-3T3 cells three days after culture initiation (two days after SeV infection) for each of the conditions were measured using Alamar blue, based on mitochondrial activity: (A) Using a plate untreated with q-pool; (B) using a plate treated with q-pool ( $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ); (C) using a plate treated with q-pool ( $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ); and (D) using a plate treated with q-pool ( $30 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) and cells infected with SeV18+IN1 at MOI = 1.

Fig. 8 is a series of photographs showing the action of SeV carrying the IN-1 gene, against the activity of q-pool, which affects the neurite outgrowth of neurons of rat dorsal root ganglion. Micrographs of neurons of the rat dorsal root ganglion 36 hours after SeV infection (60 hours after culture initiation) are shown for each of the conditions. (A) Using a plate untreated with q-pool and cells infected with SeV18+GFP at  $1 \times 10^5 \text{ CIU}/500 \mu\text{l}/\text{well}$ ; (C) using a plate treated with q-pool and cells infected with SeV18+GFP at  $1 \times 10^5 \text{ CIU}/500 \mu\text{l}/\text{well}$ ; (B) and (D) are GFP fluorescence photographs in the same visual fields as those of (A) and (C) respectively; and (E) and (F) use plates treated with q-pool and cells infected with SeV18+IN1 at  $1 \times 10^5 \text{ CIU}/500 \mu\text{l}/\text{well}$ .

Fig. 9 is a series of photographs showing a time course of changes in GFP-derived fluorescence after the intra-auricular administration of SeV vector carrying the GFP gene to mice. A transmissible-type SeV vector carrying the GFP gene (SeV18+GFP:  $5 \times 10^6 \text{ GFP-CIU}/5 \mu\text{l}$ ), or an SeV vector defective in the F gene (SeV18+GFP/ $\Delta F$ :  $5 \times 10^6 \text{ GFP-CIU}/5 \mu\text{l}$ ), was intra-auricularly administered to mice, and GFP protein fluorescence was observed from outside over time.

Fig. 10 shows a quantitative assessment (1) of the intra-auricular administration method. Assessment with an SeV vector carrying the luciferase gene: (A) Administration titer dependency. A transmissible-type SeV vector carrying the luciferase gene (SeV18+Luci) was intra-auricularly administered to mice at varied

administration titers ( $5 \times 10^4$ ,  $5 \times 10^5$ ,  $5 \times 10^6$  CIU/5  $\mu$ l), the auricles were cut off two days after administration, and the tissues were homogenized to examine luciferase activity (n=3). Changes in luciferase activity dependent on the administration titer were observed. (B) Time course: SeV18+Luci ( $5 \times 10^6$  CIU/5  $\mu$ l) was intra-auricularly administered to mice, each of the auricles were excised over time, and tissues were then homogenized to examine luciferase activity (n=3).

Fig. 11 represents photographs and a graph showing a quantitative assessment (2) of the intra-auricular administration method. Assessment with an SeV vector carrying the GFP gene: SeV18+GFP ( $5 \times 10^6$  GFP-CIU/5  $\mu$ l) was intra-auricularly administered to mice, and GFP protein fluorescence was observed from outside over time (n=4). (A) GFP fluorescence photographs. (B) Quantification of GFP fluorescence intensity. Green fluorescence was extracted with image processing software, Adobe Photoshop, and fluorescence intensity was then quantified with image-analyzing software, NIH image.

Fig. 12 is a series of photographs and a graph showing the usefulness of the intra-auricular administration method in light of a repeated administration assessment method. SeV18+GFP/ $\Delta$ F ( $5 \times 10^6$  GFP-CIU/5  $\mu$ l) was administered to the right auricle of mice (the first administration), and then one, two, four, six, eight, 28, and 62 days after administration respectively, SeV18+GFP/ $\Delta$ F ( $5 \times 10^6$  GFP-CIU/5  $\mu$ l) was administered to the left auricle (the second administration). After each of the administrations, changes in GFP fluorescence intensity were examined over time. (A) GFP fluorescence photographs. (B) Quantification of GFP fluorescence intensity.

Fig. 13 represents photographs showing the identification of infected cells by the intra-auricular administration method (1). SeV18+GFP/ $\Delta$ F ( $5 \times 10^6$  GFP-CIU/5  $\mu$ l) was intra-auricularly administered to mice, auricles were excised two days after infection, and frozen sections thereof were prepared to observe GFP fluorescence under a fluorescence microscope (A). The same continuous section was stained with an anti-GFP antibody (C). (B) shows these images superimposed.

Fig. 14 is photographs showing the identification of infected cells by the intra-auricular administration method (2). SeV18+GFP/ $\Delta$ F

( $5 \times 10^6$  GFP-CIU/5  $\mu$ l) was intra-auricularly administered to mice, auricles were excised two days after infection, and frozen sections thereof were prepared to observe GFP fluorescence under a fluorescence microscope (different mice from those in Fig. 13).

5 Fig. 15 is a schematic representation of the configurations of oligo DNAs used in synthesizing the gene fragment (SYN205-13) of the anti-CD28 antibody.

Fig. 16 is a schematic diagram showing the construction of SeV vector cDNA carrying the anti-CD28 antibody gene.

10 Fig. 17 is a photograph showing RT-PCR confirmation of the viral genome of a SeV vector carrying the anti-CD28 antibody gene (SeV18+ $\alpha$ CD28cst/ $\Delta$ F-GFP).

Fig. 18 is photographs showing antibody expression from an SeV vector carrying the  $\alpha$ CD28 gene (SeV18+ $\alpha$ CD28cst/ $\Delta$ F-GFP).

15 Fig. 19 is a series of photographs showing a time course of changes in GFP-derived fluorescence after intra-auricular administration of the SeV vector carrying the anti-CD28 antibody ( $\alpha$ CD28cst) and GFP genes (SeV18+ $\alpha$ CD28cst/ $\Delta$ F-GFP) into mice.  $5 \times 10^6$  GFP-CIU/5  $\mu$ l was intra-auricularly administered to mice, and GFP protein fluorescence 20 was observed from the outside over time, to compare it with that in the SeV18+GFP/ $\Delta$ F administered group.

Fig. 20 is a series of photographs showing a time course of changes in GFP-derived fluorescence after the intra-auricular administration of SeV18+ $\alpha$ CD28cst/ $\Delta$ F-GFP to mice, when CTLA4-Ig protein was jointly 25 administered in the initial stage of infection.  $5 \times 10^6$  GFP-CIU/5  $\mu$ l was intra-auricularly administered to mice, and one hour and ten hours after administration, CTLA4-Ig protein (0.5 mg/body) was intraperitoneally administered. GFP fluorescence was observed from outside over time, to compare with the GFP fluorescence of a similarly 30 treated SeV18+GFP/ $\Delta$ F-administered group.

Fig. 21 shows the quantification of GFP-fluorescence intensity. Based on fluorescence photographs of Figs. 19 and 20, green fluorescence was extracted with image processing software, Adobe Photoshop, and then fluorescence intensity was quantified with 35 image-analyzing software, NIH image.

Fig. 22 is a series of photographs showing differences in

GFP-derived fluorescence intensity due to differences in the site carrying the GFP gene (in vitro confirmation). SeV18+GFP/ΔF or SeV18+αCD28cst/ΔF-GFP was transfected to LLC-MK2 cells at MOI = 3, and GFP fluorescence was observed over time.

5

#### Best Mode for Carrying out the Invention

Hereinafter, the present invention will be explained in more detail with reference to Examples, but is not to be construed as being limited thereto. All the references cited herein have been 10 incorporated as parts of this description.

##### [Example 1] Construction of a SeV vector carrying Fab gene

A treatment vector aiming at the inhibition of axonal outgrowth inhibitors (such as NOGO) will be illustrated as an application of 15 SeV vectors to spinal cord lesions. Since IN-1 (mouse IgM κ type) is known as a neutralizing antibody raised against NOGO (Brosamle, C. et al., J. Neurosci. 20(21), 8061-8068 (2000) and such), a transmissible-type SeV vector carrying the IN-1 gene was constructed. An F-gene defective SeV vector (transmission-deficient type) was also 20 constructed.

###### 1) Total synthesis of the gene

To construct a SeV vector carrying the Fab (H and L chains) gene of IN-1, a total synthesis of the Fab gene of IN-1 was performed. Based on the nucleotide sequence of a single chain Fab fragment of 25 IN-1 (Accession No. Y08011; Bandtlow, C. et al., Eur. J. Biochem. 241(2) 468-475 (1996)), a sequence was designed such that the His-tag was removed, NotI recognition sites were comprised at both ends, and an H chain (SEQ ID NO: 10) and L chain (SEQ ID NO: 11) were linked in tandem, sandwiching the SeV EIS sequence between them (Fig. 1; SEQ ID NO: 9). The sequences and names of the oligo DNAs used in the 30 synthesis are shown in Fig. 2, and their configurations are shown in Fig. 3. The entire length of the NotI fragment was set so as to be 6n (a multiple of 6).

###### 2) Construction of a SeV cDNA gene carrying IN-1 (Fab)

35 The above-synthesized NotI fragment was inserted into pBluescript II KS (Stratagene, LaJolla, CA). After confirming the

gene sequence, a NotI fragment comprising EIS was excised from this plasmid by NotI cleavage, and inserted in to the +18 site (NotI site) of plasmids encoding the genomes of a transmissible-type Sendai virus (pSeV18+) (Hasan, M. K. et al., J. Gen. Virol. 78: 2813-2820, 1997; 5 Kato, A. et al., 1997, EMBO J. 16: 578-587; and Yu, D. et al., 1997, Genes Cells 2: 457-466) and an F gene-defective type Sendai virus (pSeV18+/ΔF) (Li, H.-O. et al., J. Virol. 74(14) 6564-6569 (2000)), to form pSeV18+IN-1 and SeV18+IN-1/ΔF, respectively.

3) Reconstitution of SeV (transmissible-type: SeV18+IN-1)

Viruses were reconstituted according to a report by Kato et al. (Kato, A. et al., Genes Cells 1, 569-579 (1996)). LLC-MK2 cells were seeded in dishes of 100 mm in diameter, at  $5 \times 10^6$  cells/dish, and then cultured for 24 hours. The cells were then infected at 37°C for one hour with a recombinant vaccinia virus expressing T7 polymerase (MOI=2), which had been treated with psoralen and long wavelength ultraviolet rays (365 nm) for 20 minutes, (PLWUV-Vact7: Fuerst, T.R. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 8122-8126 (1986)). The cells were washed with serum-free MEM, and then the plasmids pSeV18+IN-1, pGEM/NP, pGEM/P, and pGEM/L (Kato, A. et al., Genes Cells 1, 569-579 15 (1996)) were suspended in Opti-MEM (200 μl) (Gibco-BRL, Rockville, MD) at amount ratios of 12 μg, 4 μg, 2 μg, and 4 μg/dish, respectively. They were then mixed with SuperFect transfection reagent (Qiagen, Bothell, WA) equivalent to 1 μg DNA/5 μl, left to stand at room 20 temperature for 15 minutes, and finally added to Opti-MEM comprising 3% FBS (3 ml), added to the cells, and cultured. After five hours of culture, the cells were twice washed with serum-free MEM, and cultured for three days (P0) in MEM comprising 40 μg/ml of cytosine β-D-arabinofuranoside (AraC: Sigma, St. Louis, MO) and 7.5 μg/ml of trypsin (Gibco-BRL, Rockville, MD).

These cells were recovered, and pellets were suspended in PBS (1 ml/dish). After freeze-thawing three times, the above-described lysates were inoculated to ten-day-old embrionated eggs at 100 μl/egg. Incubation while turning the eggs was continued at 35.5°C for three days (P1). The eggs were left to stand at 4°C for four to six hours, 30 chorioallantoic fluids were recovered, and then assayed for hemagglutination activity (HA activity) to examine virus recovery.

HA' activity was measured according to a method of Kato et al. (Kato, A. et al., *Genes Cell* 1, 569-579 (1996)). That is, a viral solution was stepwise diluted with PBS using a 96-well round-bottomed plate, to prepare a two-fold dilution series of 50  $\mu$ l per well. 5 Preserved chicken blood (Cosmobio, Tokyo, Japan) diluted with PBS (50  $\mu$ l) to a 1% concentration was added to the 50  $\mu$ ls, and the mixture was left to stand at 4°C for 30 minutes, to observe hemagglutination. Of the agglutinated dilutions, the dilution rate of the highest virus dilution rate was judged to be the HA activity. Virus number can be 10 calculated by taking 1 HAU as 1x  $10^6$  viruses.

The recovered P1 chorioallantoic fluids were diluted  $10^{-5}$ -fold and  $10^{-6}$ -fold with PBS (when HAU was observed), or the dilution rate was reduced (when no HAU was observed). They were then inoculated to ten-day-old embrionated hen eggs at 100  $\mu$ l/egg, and then incubated 15 at 35.5°C for three days while turning the eggs (P2). After chorioallantoic fluids were collected, HA activity was measured to examine virus recovery. The chorioallantoic fluids recovered at P2 were diluted  $10^{-5}$ -fold and  $10^{-6}$ -fold, and then similar operations were performed (P3). The chorioallantoic fluids of P3 were recovered to 20 measure HA activity. HA activity was observed to be elevated, and viral reconstitution was judged be successful. The HA activity values (HAU) of the recovered chorioallantoic fluids are shown below. The P4 sample titer was calculated to be  $2^9$  HAU (about 5x  $10^8$  CIU/ml).

Table 1

Sample	P1	P2	P3	P4
SeV18+IN-1	$2^2$	$2^{10}$	$2^8$	$2^9$ (HAU)

25

4) Reconstitution of SeV (F gene-defective type: SeV18+IN-1/ΔF)

Viruses were reconstituted according to a report of Li et al. (Li, H.-O. et al., *J. Virology* 74, 6564-6569 (2000), WO00/70070). An F protein helper cell was used to reconstitute an F gene-defective 30 type virus. The helper cells were prepared using the Cre/loxP expression inducing system. This system utilizes a pCALNdLw plasmid designed to induce the expression of a gene product with Cre DNA recombinase (Arai, T. et al., *J. Virol.* 72: 1115-1121 (1988)). To

express the inserted gene, cells transformed with the above plasmid were infected with a recombinant adenovirus (AxCANCre) expressing Cre DNA recombinase, using a method of Saito et al. (Saito, I. et al., Nucl. Acid. Res. 23, 3816-3821 (1995); Arai, T. et al., J. Virol. 72, 1115-1121 (1998)). In the case of SeV-F protein, transformed cells comprising the F gene are listed as LLC-MK2/F7, while cells continuously expressing F protein after induction with AxCANCre are listed as LLC-MK2/F7/A.

The F gene-defective type SeV (SeV18+IN-1/ΔF) was reconstituted as follows: LLC-MK2 cells were seeded in dishes of 100 mm in diameter at  $5 \times 10^6$  cells/dish, cultured for 24 hours, and then infected with PLWUV-Vact7 at room temperature for one hour, (MOI = 2). The cells were washed with serum-free MEM, and then the plasmids pSeV18+IN-1/ΔF, pGEM/NP, pGEM/P, pGEM/L, and pGEM/F-HN were suspended in Opti-MEM at a weight ratio of 12 μg : 4 μg : 2 μg : 4 μg : 4 μg/dish respectively. They were then mixed with SuperFect transfection reagent equivalent to 1 μg DNA/5 μl, left to stand at room temperature for 15 minutes, and finally added to Opti-MEM (3 ml) comprising 3% FBS, added to the cells, and cultured. After five hours of culture, the cells were twice washed with serum-free MEM, and then cultured in MEM comprising 40 μg/ml of AraC and 7.5 μg/ml of trypsin. After 24 hours of culture, the cells were overlaid with LLC-MK2/F7/A cells ( $8.5 \times 10^6$  cells/dish), and cultured in MEM comprising 40 μg/ml of AraC and 7.5 μg/ml of trypsin for a further two days at 37°C. These cells were recovered, the pellets were suspended in Opti-MEM (2 ml/dish), and then freeze/thawed three times to prepare P0 lysate. On the other hand, LLC-MK2/F7/A cells were prepared by seeding in a 24-well plate, and, when nearly confluent, the cells were transferred into a 32°C incubator and cultured for one day. These cells were transfected with the P0 lysate of SeV18+IN-1/ΔF (200 μl/well each), and cultured in serum-free MEM comprising 40 μg/ml of AraC and 7.5 μg/ml of trypsin at 32°C. After the P2 stage, similar cultures were repeated until the P3 stage, using the P1 culture supernatant and LLC-MK2/F7/A cells seeded in a 6-well plate.

After confirming virus proliferation with HA activity, elevation of HA activity was observed in samples after the P1 stage.

The titer of samples on the fourth day of the P3 stage (P3d4) was  $2.7 \times 10^7$  CIU/ml.

5) Confirmation of the viral genome by RT-PCR

5 Viral RNA was recovered from a transmissible-type virus (SeV18+IN-1) solution (P2 sample) using a QIAGEN QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN, Bothell, WA). RT-PCR was carried out in one step using a Super Script One-Step RT-PCR with Platinum Taq Kit (Gibco-BRL, Rockville, MD). RT-PCR was performed using a combination of SYN80F12/SYN80R1 as a primer pair. A gene of the target size was 10 confirmed to be amplified, indicating that the viral gene carried the IN-1 gene (Fig. 4, panel A).

With the F-gene defective type (SeV18+IN-1/ΔF), a similar method was performed using a P3d4 sample and a combination of SYN80F12/SYN80R1 as a primer set. In this case, amplification of a gene of target size 15 was also confirmed, indicating that the viral gene carried the IN-1 gene (Fig. 4, panel B).

6) Confirmation of protein expression derived from a gene carried by SeV

20 Since IN-1 is a mouse IgM of κ type, it was detected by Western blotting using a Western blotting secondary antibody: HRP-conjugated anti-mouse IgG+IgM (Goat F(ab')2 Anti-Mouse IgG+IgM (AM14074): BioSource International) (without primary antibody).

25 LLC-MK2 cells grown to confluence in a 6-well plate were infected at MOI=5 with SeV18+IN-1 or SeV18-IN-1/ΔF. Culture supernatants were recovered two or four days after infection, and these samples were concentrated and their contaminants removed using a PAGE prep Protein Clean-Up and Enrichment Kit (Pierce). As a negative control (NC), a transmissible-type SeV vector carrying GFP gene was used for infection under the same conditions, and the recovered culture 30 supernatant was prepared and applied as described above. 300 μl of culture supernatant was treated to recover 40 μl of SDS-sample, which was applied at 10 μl/lane. Results are shown in Fig. 5. Bands of about 47 kDa and about 30 kDa were detected under oxidizing and reducing conditions, respectively. Molecular weights deduced from the amino 35 acid sequences were 24.0 kDa for the H chain and 23.4 kDa for the L chain. These results were judged to indicate that, under oxidizing

conditions, the H and L chains were in bound state, and under reducing conditions, only either the H or L chain was detected in a dissociated state, confirming Fab formation.

5 [Example 2] Functional *in vitro* assessment of SeV carrying IN-1 gene  
IN-1 is known to be a neutralizing antibody raised against the  
axonal outgrowth inhibitor NOGO (Chen, M.S. et al., *Nature* 403, 434-439  
(2000)). Therefore, to functionally assess SeV carrying the Fab gene  
of IN-1, it is necessary to observe the activity of promoting axonal  
10 outgrowth under conditions that suppress the inhibition of axonal  
outgrowth; that is, in the presence of an axonal outgrowth inhibitor.  
A spinal cord extract comprising an inhibitor is referred to as q-pool,  
and was prepared according to the method reported by Spillmann et  
al. (Spillmann, A.A. et al., *J. Biol. Chem.* 273, 19283-19293 (1998)).  
15 Spinal cords were removed from three adult rats to obtain 1.5 mg of  
q-pool. IN-1 activity was assessed according to the methods of Chen  
and of Spillmann et al. (Chen, M.S. et al., *Nature* 403, 434-439 (2000);  
Spillmann, A.A. et al., *J. Biol. Chem.* 273, 19283-19293 (1998)). Two  
assessment methods were employed, determining the spread of the mouse  
20 fibroblast cell line (NIH-3T3), and neurite outgrowth in the primary  
culture of rat fetal dorsal root ganglion (DRG).

For the assessment using NIH-3T3, q-pool was firstly diluted  
in PBS and distributed in a 96-well culture plate, to an equivalent  
of about 30  $\mu$ g/cm<sup>2</sup>, and then incubated at 37°C for two hours. The  
25 plate was twice washed with PBS, and then used for cell culture. In  
a 96-well plate treated (or untreated) with q-pool, NIH-3T3 cells  
were seeded at a ratio of 1x10<sup>3</sup> cells/well, and culture thereof was  
initiated using D-MEM comprising 10% FBS. One day after initiating  
culture, the above cells were infected with SeV of various titers.  
30 Two days after infection, morphology was inspected and cell number  
was assessed. Alamar Blue was utilized to assess cell number  
(BIOSOURCE International Inc.: California, USA). Morphologically,  
cells cultured in plates untreated with q-pool had a so-called  
fibroblast-like shape, but many spherical cells were observed when  
35 cultured in plates treated with q-pool, (Fig. 6(B)). Also, when the  
control SeV vector, SeV vector carrying the GFP gene (SeV18+GFP),

was infected to cells treated with q-pool, many spherical cells were similarly observed (Fig. 6(C)). However, in culture systems where SeV vector carrying the IN-1 gene (SeV18+IN1) was infected to cells treated with q-pool, few spherical cells and many fibroblast-like shaped cells were observed (Fig. 6(E)). That is, as already reported, the function of IN-1 in suppressing the morphological change of NIH-3T3 cells caused by q-pool was confirmed, indicating that IN-1 derived from the gene carried in the SeV vector comprised this function. Further, the same system was assessed from a viewpoint of cell number (cell proliferation). In plates not treated with q-pool, or treated with a low concentration of q-pool, the effect of suppressing the proliferation of NIH-3T3 cells was observed only when SeV18+IN1 was infected to cells at high MOIs (MOI = 3, 10, and 30) (Fig. 7(A)-(C)). Since no clear morphological lesions were observed in cells, it is judged that growth inhibition but not cell injury was observed. Although there have been no reports in this respect to date, it is conceivable that such activity may appear when the IN-1 concentration is extremely high. Further, this proliferation inhibitory effect was not observed in high concentration q-pool treatment (Fig. 7(D)). That is, in these cases, q-pool inhibits the activity of IN-1, further complementing the inhibition of q-pool activity by IN-1.

As another method for assessing IN-1 activity, assessment was performed by measuring effects on neurite outgrowth in a rat DRG primary culture system. In this case also, q-pool was firstly diluted in PBS and distributed in a 24-well type I collagen-coated culture plate (Asahi Technoglass, Chiba), to the equivalent of about 25  $\mu$ g/cm<sup>2</sup>, and then incubated at 37°C for two hours. After twice washing with PBS, the plate was used for cell culture. Dorsal root ganglion was excised from the 14-day-old embryos of SD rats (Charles River Japan, Kanagawa), and explanted in D-MEM comprising nerve growth factor (NGF, Serotec Ltd, U.K.) at a final concentration of 100 ng/ml, and 10% FBS. Twenty four hours after culture initiation, SeV18+GFP or SeV18+IN1 was infected to cells at  $1 \times 10^5$  CIU/500  $\mu$ l/well. Thirty six hours after infection, cell morphology was examined under a microscope. In plates without q-pool treatment, neurite outgrowth was observed for cells infected with the control SeV, SeV18+GFP (Fig. 8(A)); however, in

q-pool-treated plates, only very little neurite outgrowth was observed (Fig. 8 (C)). Fig. 8 (B) and Fig. 8 (D) show GFP fluorescence photographs in the same visual field as Fig. 8 (A) and Fig. 8 (C) respectively, to visualize the extent of SeV18+GFP infection. On the other hand, 5 also in q-pool-treated plates, very conspicuous neurite outgrowth was observed for cells infected with SeV18+IN1 (Fig. 8 (E) and (F)). That is, with regards to neurite outgrowth, the function of IN-1 in suppressing neurite outgrowth inhibitory activity due to q-pool was confirmed, and it was judged that IN-1 derived from the gene carried 10 in the SeV vector comprised this function.

[Example 3] An *in vivo* assessment system for assessing vector expression durability, and expression after repeated administration

To assess the potential of vector expression durability and 15 repeated administration, it is important to establish a more efficient and more reliable *in vivo* assessment system. This example discloses an assessment system by a newly developed mouse intra-auricular administration. It was proved that when a transmissible-type SeV vector carrying the GFP gene (SeV18+GFP:  $5 \times 10^6$  GFP-CIU/5  $\mu$ l), or an 20 F gene-defective type SeV vector (SeV18+GFP/ΔF:  $5 \times 10^6$  GFP-CIU/5  $\mu$ l), was intra-auricularly administered to mice, it is possible to observe fluorescence of the GFP protein expressed in infected cells noninvasively, from outside (Fig. 9). This assessment system is noninvasive, and enables time-dependent observation of the SeV 25 vector-derived protein (GFP) expression using the same individual, and thus this system can be thought to be very suitable for the assessment of gene expression durability. Further, since the time-dependent changes can be monitored in the same individual, the number of animals used in experiments can be significantly reduced. 30 As the actual time-dependent changes, GFP protein fluorescence could be observed until the fourth day of administration, with a peak on the second day, and virtual disappearance on the fifth to sixth day of administration (Fig. 9).

To judge whether or not these changes in GFP fluorescence 35 quantitatively reflect the kinetics of gene expression by SeV, a similar intra-auricular administration was performed with a

transmissible-type SeV vector carrying the luciferase gene (SeV18+Luci: Yonemitsu, Y. et al., Nat. Biotech. 18, 970-973 (2000)). Changes in luciferase protein activity were first confirmed to be observed to be dependent on administration titer (Fig. 10(A)). Next, 5 the time-dependent changes in the expression of the intra-auricular luciferase protein were quantified, confirming that its expression level slightly decreased on the fourth day of administration, with a peak on the second day, and almost base-line level expression on the seventh and eleventh days of administration (Fig. 10(B)). In this 10 case, experiments administering the same type of SeV carrying the GFP gene (SeV18+GFP) were carried out at the same time, to examine time-dependent changes in GFP fluorescence. Green fluorescence was extracted from a GFP fluorescence photograph (Fig. 11(A)) with Adobe Photoshop image processing software (Adobe Systems Incorporated, CA, 15 USA), and the fluorescence intensity was quantified with NIH image analyzing software (National Institute of Health, USA) (Fig. 11(B)). As a result, an excellent correlation was observed between the time-dependent changes obtained from the luciferase activity (Fig. 10(B)) and those obtained from the fluorescence intensity (Fig. 11(B)). 20 That is, changes in GFP fluorescence coincided well with those in luciferase activity. Therefore, monitoring of changes in GFP fluorescence intensity was judged to enable discussion of relative quantities.

Examinations were also performed for assessing expression after 25 repeated administrations. After administering SeV18+GFP/ΔF ( $5 \times 10^6$  GFP-CIU/5  $\mu$ l) to the right auricle and confirming the expression thereof, the same SeV18+GFP/ΔF ( $5 \times 10^6$  GFP-CIU/5  $\mu$ l) was administered into the left auricle at varied administration times to examine expression (Fig. 12(A)). Further, in this case also, GFP fluorescence 30 intensities were quantified and expressed (Fig. 12(B)). One and two days after the right auricular infection, the left auricular infection and expression were confirmed. However, four days after the right auricular infection, the degree of left auricular infection was significantly decreased, and six days after the right auricular 35 infection, the left auricular infection was almost gone. Eight days after the right auricular infection, there was virtually no left

auricular infection, although a slight infection was confirmed 62 days after infection. This phenomena were thought to indicate that this assessment method is a good tool for examining the effect of SeV vectors on the immune system, and at the same time, is an excellent 5 experimental system for assessing expression after repeated administrations.

Next, cells infected by intra-auricular administration to mice were examined. SeV18+ GFP/ΔF ( $5 \times 10^6$  CIU/5  $\mu$ l) was intra-auricularly administered to mice. Two days after infection, auricles were excised 10 to prepare frozen sections, which were observed for GFP fluorescence under a fluorescence microscope, and, at the same time, stained with an anti-GFP antibody (Molecular Probes Inc., Eugene OR, USA). GFP fluorescence and positive cells recognized by the anti-GFP antibody were both present in corium cells (Fig. 13). When the auricular tissues 15 of other individuals were examined, infections around the perichondrium (Fig. 14(A)), the corium near the perichondrium (Fig. 14 (B)), the corium near the epidermis (Fig. 14 (C)) and such were observed; however, there was no infection to the epidermis and elastic cartilage. Therefore, the cells infected by the present 20 administration method were judged to be auricular corium and perichondrium (including fibroblasts).

[Example 4] Construction of a SeV vector carrying anti-CD28 antibody ( $\alpha$ CD28) gene

25 T cell activation is induced by the reaction of the antigen-presenting cell's MHC class II (or class I)/antigen peptide complex with T cell receptors (a primary signal), and the reaction of CD80 (CD86) with co-stimulator molecules such as CD28 (a secondary signal or costimulatory signal). T cells thus activated are later 30 mitigated by the reaction of CD80 (CD86) with suppressive costimulator molecules such as CTLA-4. Blocking these costimulatory signals is known to induce peripheral immune tolerance. Therefore, to realize the long-term expression of the products of genes carried in SeV vectors for therapies in the living body, vectors carrying an antibody gene 35 for inhibiting a costimulatory signal-associated gene and inducing peripheral immune tolerance are exemplified. An F gene-defective type

SeV vector (transmission-deficient type), carrying a single-stranded antibody gene against CD28 ( $\alpha$ CD28), was constructed to induce immune tolerance by inhibiting T cell activation with an antibody raised against CD28.

5 Total synthesis of the gene

To construct a SeV vector carrying the  $\alpha$ CD28 gene, total synthesis of the gene was carried out. Based on the  $\alpha$ CD28 gene sequence (DDBJ database SYN507107) reported by Grosse-Hovest, L. et al., total synthesis of the  $\alpha$ CD28 (single-stranded antibody of LV chain and HV chain) gene was performed, placing XbaI sites at the both ends of the gene sequence. This synthetic XbaI fragment (SEQ ID NO: 43) (referred to as SYN205-13; six nucleotides each end comprise the XbaI site; the  $\alpha$ CD28 amino acid sequence is set forth in SEQ ID NO: 44) was introduced into the pBluescript II SK+ vector (pBluescript/ $\alpha$ CD28). 10 The sequences and names of oligo DNAs used in the synthesis are set forth below, and their dispositions are shown in Fig. 15. Further, schematic diagrams of the vector construction are shown in Fig. 16. 15 A DNA fragment was also prepared comprising an XbaI site between the mouse antibody  $\kappa$  L chain signal peptide (SEQ ID NO: 46) and the EIS sequence of SeV, and with a NheI/NotI site at both ends. The NheI site of this DNA fragment was ligated with the XbaI site of pGEM-4Z vector (Promega) to construct the cassette plasmid pGEM-4Zcst (SEQ ID NO: 45, only showing the NotI fragment comprising an EIS sequence). 20 The XbaI fragment comprising the  $\alpha$ CD28 gene of pBluescript/ $\alpha$ CD28 was introduced into the XbaI site of the pGEM-4Zcst vector, to construct  $\alpha$ CD28 gene ( $\alpha$ CD28cst gene) comprising the above-described signal peptide and EIS sequence of SeV. The total length of the NotI fragment comprising the  $\alpha$ CD28cst gene thus obtained was designed to be a multiple 25 of 6 (6n).

30

Table 2 Sequence and name of oligo DNA used in synthesis

SYN205F01 (SEQ ID NO: 47)

TCTAGAGACATCGAGCTCACTCAGTCTCCAGCTTGGCTGTCTCTAGGGCAGAGAGCCA  
CCATCT

35 SYN205F02 (SEQ ID NO: 48)

AGGGCAGAGAGCCACCATCTCCTGCAGAGCCAGTGAGAGTGTGAATATTATGTCACAAGTTA

ATGCAG  
SYN205F03 (SEQ ID NO: 49)  
ATGTCACAAGTTAATGCAGTGGTACCGAGCAGAAGCCAGGACAGCCACCCAAACTCCTCATCTT  
TGCTGC  
5 SYN205F04 (SEQ ID NO: 50)  
CCTTACACGTTGGAGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAACGGGGAGGCGGCGTTCTGGCGGTG  
GCGGAT  
SYN205F05 (SEQ ID NO: 51)  
CGGTTCTGGCGGTGGCGGATCAGGTGGCGGAGGCTCGCAGGTGAAACTGCAGCAGTCTGGACCT  
10 GGCCTG  
SYN205F06 (SEQ ID NO: 52)  
AGCAGTCTGGACCTGGCTGGTACGCCCTCACAGAGCCTGCCATCACTGTACTGTCTCTGG  
GTTTTC  
SYN205F07 (SEQ ID NO: 53)  
15 GACAACCTCAAGAGCCAAGTTTCTTAAAAATGAACAGTCTGCAAGCTGATGACACAGCCGTG  
ATTACT  
SYN205F08 (SEQ ID NO: 54)  
TGACACAGCCGTATTACTGTGCCAGAGATAAGGGATACTCCTATTACTATTCTATGGACTAC  
TGGGGC  
20 SYN205R01 (SEQ ID NO: 55)  
TCTAGACGAGGAGACAGTGACCGTGGTCCCTGGCCCCAGTAGTCCATAGAAT  
SYN205R02 (SEQ ID NO: 56)  
ACTGGCTTGGAGTTGTCTTGCTGATGCTTTCTGGACATGAGAGCCGAATTATAATTG  
TGCCTC  
25 SYN205R03 (SEQ ID NO: 57)  
CGAATTATAATTCGTCCTCCACCAAGCCCATTACTCCAGCCACTCCAGTCCCTGTCCTGGA  
GACTGG  
SYN205R04 (SEQ ID NO: 58)  
30 GTCCCTGTCCTGGAGACTGGCGAACCCAGTAGAACACCATAGTCGCTTAATGAAAACCCAGAGAC  
AGTACA  
SYN205R05 (SEQ ID NO: 59)  
CCCCCTCCGAACGTGTAAGGAACCTTCCTACTTGCTGACAGAAATACATTGCAACATCATCCT  
CGTCCA  
SYN205R06 (SEQ ID NO: 60)  
35 TGCAACATCATCCTCGTCCACAGGATGGATGTTGAGGCTGAAGTTGTCCAGACCCACTGCCA  
CTAAAC

SYN205R07 (SEQ ID NO: 61)

CAGACCCACTGCCACTAACCTGGCAGGGACCCAGATTCTACGTTGGATGCAGCAAAGATGAG  
GAGTTT

5

Construction of F gene-defective type SeV cDNA carrying  $\alpha$ CD28 gene  
(pSeV18+ $\alpha$ CD28cst/ $\Delta$ F-GFP)

After confirming the gene sequence of the above-constructed NotI fragment, the NotI fragment was excised from this plasmid, and inserted to the +18 site (NotI site) of the F gene-defective type SeV cDNA carrying the green fluorescent protein (GFP) gene (pSeV18+/ $\Delta$ F-GFP) (Li, H.-O. et al., J. Virol. 74(14) 6564-6569 (2000)) to construct pSeV18+ $\alpha$ CD28cst/ $\Delta$ F-GFP.

3) Reconstitution of F gene-deficient type SeV carrying  $\alpha$ CD28 gene  
15 (SeV18+ $\alpha$ CD28cst/ $\Delta$ F-GFP)

Viral reconstitution was carried out according to the report by Li et al. (Li, H.-O. et al., J. Virology 74: 6564-6569 (2000), WO00/70070). An F protein helper cell was utilized to reconstitute an F gene-deficient type virus. The helper cell was prepared using the Cre/loxP expression inducing system. This system utilizes the pCALNdLw plasmid, designed to induce the expression of a gene product with Cre DNA recombinase (Arai, T. et al., J. Virol. 72: 1115-1121 (1988)). To express the inserted gene, cells transformed with the above plasmid were infected with the recombinant adenovirus (AxCANCre) expressing Cre DNA recombinase, according to the method of Saito et al. (Saito, I. et al., Nucl. Acid. Res. 23, 3816-3821 (1995), Arai, T. et al., J. Virol. 72, 1115-1121 (1998)). In the case of SeV-F protein, transformed cells comprising the F gene are described as LLC-MK2/F7, while cells continuously expressing F protein after induction with AxCANCre are described as LLC-MK2/F7/A.

SeV18+ $\alpha$ CD28cst/ $\Delta$ F-GFP was reconstituted as follows: LLC-MK2 cells were seeded in dishes of 100 mm diameter at  $5 \times 10^6$  cells/dish, cultured for 24 hours, and then infected with PLWUV-VacT7 at room temperature for one hour (MOI = 2). After the cells were washed with serum-free MEM, plasmids pSeV18+ $\alpha$ CD28cst/ $\Delta$ F-GFP, pGEM/NP, pGEM/P, pGEM/L, and pGEM/F-HN were suspended in Opti-MEM at a weight ratio

of 12 µg: 4 µg: 2 µg : 4 µg : 4 µg/dish respectively, and then mixed with a 1 µg DNA/5 µl-equivalent SuperFect transfection reagent. The mixture was left to stand at room temperature for 15 minutes, added into Opti-MEM (3 ml) comprising 3% FBS, added to the cells, and then cultured. After culturing for five hours, the cells were washed with a serum-free MEM twice, and then cultured in MEM comprising 40 µg/ml of AraC and 7.5 µg/ml of trypsin. After 24 hours of culture, the cells were overlaid with LLC-MK2/F7/A cells ( $8.5 \times 10^6$  cells/dish), and cultured for further 2 days at 37°C in MEM comprising 40 µg/ml of AraC and 7.5 µg/ml of trypsin. These cells were recovered, and pellets were suspended in Opti-MEM (2 ml/dish), and then freeze/thawed three times to prepare P0 lysate. On the other hand, LLC-MK2/F7/A cells were prepared by seeding to a 24-well plate. When they reached near confluence, they were transferred to a 32°C incubator and cultured for one day. These cells were transfected with P0 lysate of SeV18+αCD28cst/ΔF-GFP (200 µl/well each), and cultured in serum-free MEM comprising 40 µg/ml of AraC and 7.5 µg/ml of trypsin at 32°C. After the P2 stage, similar cultures were repeated until the P3 stage, using the P1 culture supernatant and LLC-MK2/F7/A cells seeded in a 6-well plate.

The P3 virus titer on the fifth day (P3d5) was  $7 \times 10^6$  CIU/ml.

#### 4) Confirmation of viral genome by RT-PCR

Viral RNA was recovered from a viral solution (P3 sample) of an F gene-deficient type SeV, SeV18+αCD28cst/ΔF-GFP, using a QIAGEN QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN, Bothell, WA). RT-PCR was carried out in one step using a Super Script One-Step RT-PCR with Platinum Taq Kit (Gibco-BRL, Rockville, MD). RT-PCR was carried out using a combination of F6 (5'-acaagagaaaaacatgtatgg-3')/R199 (5'-GATAAACAGCACCTCCTCCGACT-3') (SEQ ID NOS: 62 and 63 respectively) as a pair of primers. A gene of target size was confirmed to be amplified, confirming that the viral gene carried the αCD28cst gene (Fig. 17).

#### 5) Confirmation of protein expression derived from SeV-carried gene

In a 6-well plate, LLC-MK2 cells grown to confluence were infected with SeV18+αCD28cst/ΔF-GFP at MOI = 1, provided with serum-free MEM (1 ml), and cultured at 37°C (in the presence of 5% CO<sub>2</sub>). MEM was exchanged one day after infection, and the culture

supernatant was recovered as the sample after four days. As a negative control (NC), cells were infected with the F gene-deficient type SeV vector carrying the GFP gene (SeV18+GFP/ΔF) under the same conditions, and culture supernatant was recovered. Samples were condensed using 5 a PAGE prep Protein Clean-Up and Enrichment Kit (Pierce), such that 300 µl of the culture supernatant was concentrated to 40 µl, and applied as samples for SDS-PAGE electrophoresis at 5 µl/lane for Western blotting. On the other hand, for the Coomassie Brilliant Blue (CBB) staining, 600 µl of culture supernatant was condensed to 40 µl by a 10 similar process, and applied at 10 µl/lane for testing. As an antibody for Western blotting detection, an Anti-mouse Ig, horseradish peroxidase-linked whole antibody (from sheep) was used (Amersham Bioscience). Fig. 18 shows the results. A band of about 29 kDa was detected, coinciding with the molecular weight predicted from the 15 amino acid sequence.

[Example 5] Assessment of in vivo expression durability of SeV carrying anti-CD28 antibody gene

As part of the functional assessment of the constructed F 20 gene-deficient type SeV carrying an anti-CD28 antibody ( $\alpha$ CD28cst) gene (SeV18+ $\alpha$ CD28cst/ΔF-GFP), the in vivo expression durability thereof was assessed. In this case, differences in durability were examined using an F gene-deficient type SeV carrying the GFP gene, without the anti-CD28 antibody gene (SeV18+GFP/ΔF), as a control. 25 In this case also, because there was no (or very little) expression of the  $\alpha$ CD28cst protein in the initial stages of infection, with the aim of supplementing this protein at this stage, assessment was also performed in a system in which the CTLA4-Ig protein, which is expected 30 to comprise a similar function to that of the  $\alpha$ CD28cst protein, was administered on the same day as SeV administration. Although the CTLA4-Ig protein is commercially available (Ancell Corporation), this time the protein employed was prepared by methods similar to that previously reported (Iwasaki, N. et al., Transplantation 73(3) 334-340 (2002); Harada, H. et al., Urol. Res. 28(1) 69-74 (2000); Iwasaki, 35 N. et al., Transplantation 73(3) 334-340 (2002); Glysing-Jensen, T. et al., Transplantation 64(12) 1641-1645 (1997)).

Expression durability was assessed by the method using the mouse intra-auricular administration shown in Example 3. When a SeV vector comprising the GFP gene is intra-auricularly administered to mice, fluorescence of the GFP protein expressed in infected cells can be observed non-invasively from outside. This system enables the observation of SeV vector-derived protein (GFP) expression over time, using the same individual. Therefore, it is extremely suitable for assessment of gene expression durability. The F gene-deficient type SeV vector carrying the GFP gene (SeV18+GFP/ΔF:  $5 \times 10^6$  CIU/5 μl) or that carrying the anti-CD28 antibody gene together with the GFP gene (SeV18+αCD28cst/ΔF-GFP:  $5 \times 10^6$  CIU/5 μl) was intra-auricularly administered to mice to observe GFP protein expression over time. Further, some of the mice in the both administered groups were intraperitoneally injected with CTLA4-Ig protein at 0.5 mg/body, one hour and ten hours after infection with SeV (n = 2 each). Firstly, the SeV vector carrying an antibody gene (αCD28cst gene in this case) aiming at suppressing the costimulatory factor was confirmed to be infectious, even *in vivo* (Fig. 19). A difference in GFP expression levels was observed as compared to SeV18+GFP/ΔF, and this is explained below. As for durability, durability of GFP protein, though very slight, was observed in the SeV18+αCD28cst/ΔF-GFP administered group as compared to the control. That is, in the SeV18+GFP/ΔF administered group, clear expression of GFP was observed until five days after administration, but six days after administration a sudden disappearance was observed, with almost no GFP expression. On the contrary, in the SeV18+αCD28cst/ΔF-GFP administered group, the decrease was slight and gradual, and fluorescence of GFP was observed even six days after administration (Fig. 19). The effects of CTLA4-Ig protein administration on the same day as SeV infection were clearly shown. Enhanced GFP expression was observed on administration of the CTLA4-Ig protein in both of the SeV18+GFP/ΔF administered group and the SeV18+αCD28cst/ΔF-GFP administered group. Further, in the SeV18+αCD28cst/ΔF-GFP administered group, a relatively clear GFP fluorescence was observed even six days after infection (Fig. 20). The green fluorescence was extracted from GFP fluorescence photographs using Adobe Photoshop image processing software (Adobe Systems

Incorporated, CA, USA), and fluorescence intensity was quantified with the image analyzing software, NIH image (National Institute of Health, USA). Fig. 21 shows the results. Along with the increase in GFP expression when CTLA4-Ig protein was administered, the effect, though slight, of carrying the  $\alpha$ CD28cst gene in SeV on the expression durability of a protein (GFP in this case) derived from the SeV-carried gene, was confirmed. These results demonstrate the effect of inhibiting costimulator activity on SeV infection and its durability, indicating the certainty of this concept. Furthermore, even though infection with the SeV vector alone has little effect on expression durability, the results indicate the possibility of prolonging expression durability by simultaneously administering a protein expected to have a similar mechanism at the initial stage of SeV infection.

Fluorescence due to GFP protein was confirmed to be weaker in the SeV18+ $\alpha$ CD28cst/ $\Delta$ F-GFP administered group than in the SeV18+GFP/ $\Delta$ F administered group, using an *in vitro* system as described below. LLC-MK2 cells were infected with either SeV18+GFP/ $\Delta$ F or SeV18+ $\alpha$ CD28cst/ $\Delta$ F-GFP at MOI = 5, and GFP expression was observed over time under a fluorescence microscope (Fig. 22). Sixteen hours after infection, GFP was observed in cells infected with SeV18+GFP/ $\Delta$ F, but not in cells infected with SeV18+ $\alpha$ CD28cst/ $\Delta$ F-GFP. GFP fluorescence was confirmed to be expressed in cells infected with SeV18+ $\alpha$ CD28cst/ $\Delta$ F-GFP from 24 hours after infection was observed, however the fluorescence was always weaker, and the expression level was also lower than for cells infected with SeV18+GFP/ $\Delta$ F. A polar effect is known regarding differences in the amount of expression of a gene carried in the SeV genome (Glazier, K. et al., J. Virol. 21 (3), 863-871 (1977); Homann, H.E. et al., Virology 177 (1), 131-140 (1990)). That is, since the restart efficiency of RNA polymerase is not high, the closer a gene is to the 3'-end of the genome, the higher its expression level becomes, and the closer a gene is to the 5'-end, the lower its expression level becomes. In fact, the polar effect was proved by carrying the same marker gene at various sites, and expression level-controlling designs were proposed at the same time (Tokusumi, T. et al., Virus Res 86, 33-38 (2002)). The GFP gene used

in the present detections was carried at the 3'-end in SeV18+GFP/ΔF, but at the site of the deficient F gene in SeV18+αCD28cst/ΔF-GFP. According to this design, the GFP level is high in SeV18+GFP/ΔF but relatively low in SeV18+αCD28cst/ΔF-GFP. However, since other SeV 5 proteins are expected to be similarly expressed (about the same amount) for both vectors, it is presumed that proteins causing immunogenicity are expressed at about the same level, and that only the detection protein (GFP) is reduced in cells infected with SeV18+αCD28cst/ΔF-GFP. Considering the above results, the slight extension of gene expression 10 confirmed in the SeV18+αCD28cst/ΔF-GFP administered group, using an intra-auricular administration system, suggests the actual extending effect is greater than that predicted from observations of GFP.

#### Industrial Applicability

15 The present invention has provided paramyxoviral vectors expressing polypeptides comprising antibody variable regions. The vectors of this invention are suitable as vectors for gene therapy to be administered *in vivo* or *ex vivo* to the living body. In particular, a vector expressing an antibody fragment against a neural elongation 20 inhibitor is useful in gene therapy for the nerve lesion. Further, a vector of this invention expressing an antibody inhibiting the signal transduction of immune activation enables a long-term expression of a gene from the vector and a repeated administration thereof.

## CLAIMS

1. A paramyxoviral vector encoding a polypeptide that comprises an antibody variable region.
- 5 2. The viral vector of claim 1, wherein the paramyxovirus is a Sendai virus.
- 10 3. The viral vector of claim 1, wherein the polypeptide is a secretory type.
4. The paramyxoviral vector of claim 1, wherein the vector encodes a polypeptide comprising an antibody H chain variable region, and a polypeptide comprising an antibody L chain variable region.
- 15 5. The viral vector of claim 4, wherein the polypeptide comprising an antibody H chain variable region and the polypeptide comprising an antibody L chain variable region are linked to each other to form a Fab.
- 20 6. The viral vector of claim 5, wherein at least one of the antibody variable regions is derived from an antibody against a ligand or a receptor.
- 25 7. The viral vector of claim 6, wherein the antibody binds to a protein that inhibits the survival or differentiation of neurons or axonal outgrowth.
8. The viral vector of claim 7, wherein the antibody is an antibody against a NOGO.
- 30 9. The viral vector of claim 6, wherein the antibody is an antibody against a receptor associated with immune signal transduction, or a ligand thereof.
- 35 10. The vector of claim 9, wherein the antibody is an antibody against

a receptor expressed on the surface of a T cell or antigen-presenting cell, or a ligand thereof.

11. The vector of claim 10, wherein the receptor or ligand thereof  
5 is a signal transduction molecule of a costimulatory signal of a T cell or antigen-presenting cell.

12. The vector of claim 11, wherein the signal transduction molecule  
10 is a molecule selected from the group consisting of CD28, CD80, CD86, LFA-1, ICAM-1 (CD54), PD-1, and ICOS.

13. The vector of claim 9, wherein the vector further encodes another  
foreign gene.

15 14. A method for manufacturing a recombinant polypeptide comprising  
an antibody variable region, wherein the method comprises the steps  
of:  
(a) transducing the viral vector of claim 1 to a mammalian cell; and  
(b) recovering a produced polypeptide from the mammalian cell  
20 transduced with the vector, or the culture supernatant thereof.

15. A polypeptide produced by the method of claim 14.

16. A method for promoting nerve formation, wherein the method  
25 comprises the step of delivering the vector of claim 7 to a site in  
which the nerve formation is required.

17. A method for treating a spinal cord lesion, wherein the method  
comprises the step of delivering the vector of claim 7 to the lesion  
30 site.

18. A method for suppressing an immune reaction, wherein the method  
comprises the step of administering the vector of claim 9.

35 19. The method of claim 18, wherein the method further comprises the  
step of administering an antibody against a receptor associated with

immune signal transduction, or a ligand thereof, or CTLA-4 or a fragment thereof.

20. A method for increasing the expression of a gene from a vector by prolonging gene expression from the vector, and/or by the repeated administration of the vector, wherein the method comprises the step of administering the vector of claim 9.

21. The method of claim 20, wherein the method further comprises the step of administering an antibody against a receptor associated with immune signal transduction, or a ligand thereof, or CTLA-4 or a fragment thereof.

22. A composition of a vector with elevated durability of expression, comprising the vector of claim 9 and a pharmaceutically acceptable carrier.

23. A gene transduction kit, comprising (a) the vector of claim 9 and (b) an antibody against a receptor associated with immune signal transduction, or a ligand thereof, or CTLA-4 or a fragment thereof.

## ABSTRACT

The present invention provides paramyxoviral vectors expressing polypeptides that comprise antibody variable regions. A vector of this invention, encoding antibody variable regions of the H and L chains, succeeded in simultaneously expressing these antibody chains to form a Fab, and further succeeded in expressing a single chain antibody at a high level. The vectors of this invention are suitable as vectors for gene therapy, to be administered *in vivo* or *ex vivo* to living bodies. In particular, vectors expressing antibody fragments against neurite outgrowth inhibitors are useful in gene therapies for nerve lesions. Further, vectors of this invention that express antibodies which inhibit immune activation signal transduction enable the long-term expression of genes from the vectors.

(19)世界知的所有権機関  
国際事務局

(43)国際公開日

2003年12月11日 (11.12.2003)

PCT

(10)国際公開番号

WO 03/102183 A1

(51) 国際特許分類: C12N 15/09, 7/00, A61K 35/76, 39/395, 48/00, A61P 19/08, 25/00, 37/06, 43/00, C07K 16/18, 16/28, C12P 21/02

(21) 国際出願番号: PCT/JP03/07005

(22) 国際出願日: 2003年6月3日 (03.06.2003)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ: 特願2002-161964 2002年6月3日 (03.06.2002) JP

(71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 株式会社ディナベック研究所 (DNAVEC RESEARCH INC.) [JP/JP]; 〒305-0856 茨城県つくば市観音台1丁目25番11号 Ibaraki (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 井上誠 (INOUE,Makoto) [JP/JP]; 〒305-0856 茨城県つくば市観音台1丁目25番11号 株式会社ディナベック研究所内 Ibaraki (JP). 長谷川謹 (HASEGAWA,Mamoru) [JP/JP]; 〒305-0856 茨城県つくば市観音台1丁目25番11号 株式会社ディナベック研究所内 Ibaraki (JP). 弘中孝史 (HIRONAKA,Takashi) [JP/JP]; 〒305-

0856 茨城県つくば市観音台1丁目25番11号 株式会社ディナベック研究所内 Ibaraki (JP).

(74) 代理人: 清水初志 外 (SHIMIZU,Hatsushi et al.); 〒300-0847 茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階 Ibaraki (JP).

(81) 指定国(国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(広域): ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:  
— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイドスノート」を参照。

(54) Title: PRAMYXOVIRUS VECTORS ENCODING ANTIBODY AND UTILIZATION THEREOF

(54) 発明の名称: 抗体をコードするパラミクソウイルスベクターおよびその利用

A1

(57) Abstract: It is intended to provide a paramyxovirus vector expressing a polypeptide containing antibody variable regions. This vector, which encodes antibody H chain and L chain variable regions, expresses these antibody chains at the same time to form Fab. Also, a single-stranded antibody is successfully expressed at a high level. The above vector is appropriately usable as a gene therapeutic vector to be administered to a living body either *in vivo* or *ex vivo*. In particular, a vector expressing an antibody fragment against nerve elongation inhibitor is useful in treating nerve injury. The above vector expressing an antibody which inhibits immunopotentiation signal transfer enables the prolonged expression of a gene from the vector.

(57) 約: 本発明は抗体可変領域を含むポリペプチドを発現するパラミクソウイルスベクターを提供する。抗体H鎖およびL鎖の可変領域をコードする本発明のベクターは、これらの抗体鎖を同時に発現しFabを形成した。また一本鎖抗体を高レベルで発現させることにも成功した。本発明のベクターは、インビボまたはエクスピボにより生体内に投与するための遺伝子治療ベクターとして適している。特に神経伸長阻害因子に対する抗体断片を発現するベクターは、神経損傷への遺伝子治療に有用である。また、免疫活性化シグナル伝達を阻害する抗体を発現する本発明のベクターは、ベクターからの遺伝子の長期発現を可能にする。

WO 03/102183 A1

## 明細書

### 抗体をコードするパラミクソウイルスベクターおよびその利用

#### 技術分野

本発明は、抗体可変領域を含むポリペプチドをコードするパラミクソウイルスベクターおよびその利用に関する。

#### 背景技術

モノクローナル抗体は医薬品としてその有用性が広く認識されており、既に10種以上のモノクローナル抗体医薬が販売もしくは販売に向けて準備が進められている状況にある (Dickman, S., *Science* 280: 1196-1197, 1998)。モノクローナル抗体医薬の特徴はやはりその選択性にあり、唯一特定の抗原と結合し、阻害或いは排除等の活性を発現することから、今後も医薬品としての発展が期待されている。モノクローナル抗体医薬は、通常は哺乳動物のハイブリドーマで作製されるが、一般的には生産コストが高いこと、また通常は全身デリバリーでの投与になるため、軽微な場合でも発熱等の副作用が生じることが問題点として指摘されている。大腸菌等のバクテリア、酵母、あるいは昆虫細胞によって抗体を產生する試みもあるが、糖鎖修飾の違いなどが抗体の生物活性および抗体蛋白質の抗原性に影響を及ぼす懸念がある。

#### 発明の開示

本発明は、抗体可変領域を含むポリペプチドをコードするパラミクソウイルスベクターおよびその利用を提供することを課題とする。

本発明者らは、現在広く利用されている、及び今後利用拡大が予想されるモノ

クローナル抗体医薬を、遺伝子導入ベクターを介して発現させることができれば、病巣近辺での局所的な発現が可能となり、副作用の軽減とともに、モノクローナル抗体医薬の開発上必ず発生するコスト面での問題を解決する可能性が高いと考えた。

近年、遺伝子治療を目的として多様な遺伝子導入用ベクターが開発されており、ベクターの種類にもよるが、遺伝子導入細胞での局所的な発現を期待することができる。中でも本発明者らはこれまで、センダイウイルス (SeV) を用いて遺伝子治療にも使用できる新しい遺伝子導入用および遺伝子治療用のベクターの開発を行ってきた。SeVは非分節型マイナス鎖RNAウイルスで、パラミクソウイルス (Paramyxovirus) に属し、*murine parainfluenza virus*の一種である。本発明者らは、モノクローナル抗体を発現するSeVを新規に構築し、これを用いて生体内でモノクローナル抗体を発現させる新たな遺伝子治療を確立するため実験を行った。本発明者らは、伝播型および伝播能欠損型の2種のSeVを用いて、神経軸索伸長阻害因子 (NOGO) に対する中和抗体 (IN-1) のFab (H鎖及びL鎖) 遺伝子を搭載したベクターを構築した。両ベクターともに再構成に成功し、伝播型で $2^9$  HAU (約 $5 \times 10^8$  CIU/mL) 、伝播能欠損型 (F遺伝子欠失型) で $2.7 \times 10^7$  CIU/mL のベクターを回収することに成功した。このベクターを導入した細胞の培養上清からは、酸化条件で約47 kDa、還元条件で約30 kDaのバンドが検出され、酸化条件ではH鎖及びL鎖が結合したFab抗体が形成されていると判断された。軸索伸長阻害因子に対する抗体を発現するベクターは、脊髄損傷への応用が想定され、本ベクターを用いた脊髄傷害に対する遺伝子治療が可能となる。

また本発明者らは、抗体を発現するパラミクソウイルスベクターは、免疫原性が抑制されたベクターとしても有用であることを見出した。ウイルスベクターの生体内投与においては導入されたウイルスに対する免疫が誘導され、これによりウイルスベクターが排除され導入遺伝子の長期発現が阻害される。このような状況では、ベクターの複数回投与も困難となる。ベクターに免疫誘導を抑制する作

用を持たせれば、ベクターに対する免疫反応を抑制し、導入遺伝子の長期発現および複数回投与（繰り返し投与）が可能となる。このためには、免疫シグナル分子に対する抗体を発現するベクターが有効である。例えば、T細胞などの免疫細胞におけるT細胞受容体（TCR）、抗原、及び組織適合性抗原（MHC）に由来するシグナルと共同して働く、第二のシグナルであるコスティミュラトリーシグナル（co-stimulatory signal；補助刺激）分子に対する抗体をベクターから発現させることにより、この第二のシグナルを欠如させ、T細胞を不活化させることができる。このようなパラミクソウイルスベクターは、ベクターに対する細胞性免疫を抑制し、導入遺伝子の長期発現を可能とする。

このように本発明において提供されるベクターは、特に遺伝子治療等において生体に投与するベクターとして適しており、種々の疾病および傷害への適用が期待できる。また、パラミクソウイルスベクターは哺乳動物細胞において導入遺伝子を極めて高いレベルで発現することが可能であることから、ヒトを含めた哺乳動物細胞で所望の抗体を大量に製造させることも可能である。このように、抗体を発現するパラミクソウイルスベクターは、臨床的にも産業的にも高い有用性を有している。

すなわち本発明は、抗体の可変領域を含むポリペプチドをコードするパラミクソウイルスベクターおよびその利用に関し、より具体的には、

- (1) 抗体可変領域を含むポリペプチドをコードするパラミクソウイルスベクター、
- (2) パラミクソウイルスがセンダイウイルスである、(1)に記載のウイルスベクター、
- (3) 該ポリペプチドが分泌型である、(1)に記載のウイルスベクター、
- (4) 抗体のH鎖可変領域を含むポリペプチド、および抗体のL鎖可変領域を含むポリペプチドをコードしている(1)に記載のパラミクソウイルスベクター、
- (5) 抗体のH鎖可変領域を含むポリペプチド、および抗体のL鎖可変領域を含

むポリペプチドが、互いに結合して F a b を構成する、(4) に記載のウイルスベクター、

(6) 抗体可変領域の少なくとも 1 つがリガンドまたは受容体に対する抗体に由来する、(5) に記載のウイルスベクター、

(7) 抗体が神経細胞の生存、分化、または神経突起伸長を阻害する因子に結合する、(6) に記載のウイルスベクター、

(8) 抗体が NOGO に対する抗体である、(7) に記載のウイルスベクター、

(9) 抗体が免疫シグナル伝達の受容体またはそのリガンドに対する抗体である、(6) に記載のウイルスベクター、

(10) 抗体が、T 細胞または抗原提示細胞の表面に発現する受容体またはそのリガンドに対する抗体である、(9) に記載のベクター、

(11) 該受容体またはそのリガンドが、T 細胞または抗原提示細胞のコスティミュラトリーシグナルのシグナル伝達分子である、(10) に記載のベクター、

(12) 該シグナル伝達分子が、CD28、CD80、CD86、LFA-1、ICAM-1 (CD54)、PD-1、および ICOS からなる群より選択される分子である、(11) に記載のベクター、

(13) さらに他の外来遺伝子をコードしている、(9) に記載のベクター、

(14) 抗体可変領域を含む組み換えポリペプチドの製造方法であって、

(a) (1) に記載のウイルスベクターを哺乳動物細胞に導入する工程、および

(b) 該ベクターが導入された哺乳動物細胞またはその培養上清から、産生されたポリペプチドを回収する工程、を含む方法、

(15) (14) に記載の方法により製造されたポリペプチド、

(16) 神経形成を促進する方法であって、神経を形成させる必要がある部位に

(7) に記載のベクターを送達する工程を含む方法、

(17) 脊髄損傷の治療方法であって、該損傷部位に (7) に記載のベクターを

送達する工程を含む方法、

(18) (9) に記載のベクターを投与する工程を含む、免疫反応を抑制する方法、

(19) 免疫シグナル伝達の受容体またはそのリガンドに対する抗体、あるいはCTLA4またはその断片を投与する工程をさらに含む、(18) に記載の方法、

(20) ベクターからの遺伝子の発現を持続させるおよび／またはベクターの繰り返し投与によるベクターからの遺伝子の発現を増強する方法であって、(9) に記載のベクターを投与する工程を含む方法、

(21) 免疫シグナル伝達の受容体またはそのリガンドに対する抗体、あるいはCTLA4またはその断片を投与する工程をさらに含む、(20) に記載の方法、

(22) 発現持続性が上昇したベクター組成物であって、(9) に記載のベクターおよび薬学的に許容される担体を含む組成物、

(23) 遺伝子導入キットであって、(a) (9) に記載のベクター、ならびに(b) 免疫シグナル伝達の受容体またはそのリガンドに対する抗体あるいはCTLA4またはその断片、を含むキット、に関する。

本発明において「抗体」とは、イムノグロブリンの可変領域を含むポリペプチドを総称し、具体的にはイムノグロブリン鎖 (H鎖またはL鎖)、その可変領域を含む断片、および該断片を含むポリペプチドが含まれる。抗体は、天然の抗体であっても人工的に作出した抗体であってもよい。例えば、2種またはそれ以上の抗体のキメラ (例えばヒトおよび他の哺乳動物のキメラ抗体) などであってもよく、Fc領域の置換あるいはCDRグラフトなどで構築した組み換え抗体 (例えばヒト化抗体など) は本発明において抗体に含まれる。「イムノグロブリン可変領域」とは、イムノグロブリンH鎖またはL鎖の可変領域 (すなわち $V_H$ または $V_L$ ) またはその部分を言う。L鎖は $\kappa$ 鎖であっても $\gamma$ 鎖であってもよい。本発明において可変領域は相補性決定領域 (CDR) のいずれかを含むアミノ酸配列からなっていてよく、具

体的にはH鎖またはL鎖のCDR1、CDR2、およびCDR3のいずれかを含むものであつてよい。好ましくは本発明においてイムノグロブリン可変領域は、H鎖またはL鎖のCDR1、CDR2、およびCDR3の3つのCDRを含む領域である。本発明においてイムノグロブリンは任意のクラスに属するものが含まれ、例えば IgM、IgG、IgA、IgE、および IgD を含む。

組み換えウイルスとは、組み換えポリヌクレオチドを介して生成したウイルスを言う。組み換えポリヌクレオチドとは、自然の状態と同じようには結合していないポリヌクレオチドを言う。具体的には、組み換えポリヌクレオチドは、人の手によってポリヌクレオチド鎖の結合が改変（切断または結合）されたポリヌクレオチドである。組み換えポリヌクレオチドは、ポリヌクレオチド合成、ヌクレーゼ処理、リガーゼ処理等を組み合わせて、公知の遺伝子組み換え方法により生成させることができる。組み換え蛋白質は、蛋白質をコードする組み換えポリヌクレオチドを発現させることにより生産することができる。組み換えウイルスは、遺伝子操作により構築されたウイルスゲノムをコードするポリヌクレオチドを発現させ、ウイルスを再構築することによって生成することができる。組み換え蛋白質とは、組み換えポリヌクレオチドを介して生成した蛋白質または人工的に合成された蛋白質を言う。

本発明において遺伝子とは遺伝物質を指し、転写単位をコードする核酸を言う。遺伝子はRNAであってもDNAであってもよい。本発明において蛋白質をコードする核酸は、該蛋白質の遺伝子と呼ぶ。また遺伝子は蛋白質をコードしていないよく、例えば遺伝子はリボザイムまたはアンチセンスRNAなどの機能的RNAをコードするものはリボザイムまたはアンチセンスRNAの遺伝子を呼ぶ。遺伝子は天然由来または人為的に設計された配列であり得る。また、本発明において「DNA」とは、一本鎖DNAおよび二本鎖DNAを含む。また蛋白質をコードするとは、ポリヌクレオチドが該蛋白質を適当な条件下で発現できるように、該蛋白質のアミノ酸配列をコードするORFをセンスまたはアンチセンスに含むことを言う。

本発明においてパラミクソウイルスとはパラミクソウイルス科 (Paramyxoviridae) に属するウイルスまたはその誘導体を指す。パラミクソウイルスは、非分節型ネガティブ鎖RNAをゲノムに持つウイルスのグループの1つで、パラミクソウイルス亜科 (Paramyxovirinae) (レスピロウイルス属 (パラミクソウイルス属とも言う)、ルプラウイルス属、およびモービリウイルス属を含む) およびニューモウイルス亜科 (Pneumovirinae) (ニューモウイルス属およびメタニューモウイルス属を含む) を含む。本発明を適用可能なパラミクソウイルスとしては、具体的にはセンダイウイルス (Sendai virus)、ニューカッスル病ウイルス (Newcastle disease virus)、おたふくかぜウイルス (Mumps virus)、麻疹ウイルス (Measles virus)、RSウイルス (Respiratory syncytial virus)、牛痘ウイルス (rinderpest virus)、ジステンパーウイルス (distemper virus)、サルパラインフルエンザウイルス (SV5)、ヒトパラインフルエンザウイルス1, 2, 3型等が挙げられる。より具体的には、例えば Sendai virus (SeV)、human parainfluenza virus-1 (HPIV-1)、human parainfluenza virus-3 (HPIV-3)、phocine distemper virus (PDV)、canine distemper virus (CDV)、dolphin molbillivirus (DMV)、peste-des-petits-ruminants virus (PDPR)、measles virus (MV)、rinderpest virus (RPV)、Hendra virus (Hendra)、Nipah virus (Nipah)、human parainfluenza virus-2 (HPIV-2)、simian parainfluenza virus 5 (SV5)、human parainfluenza virus-4a (HPIV-4a)、human parainfluenza virus-4b (HPIV-4b)、mumps virus (Mumps)、およびNewcastle disease virus (NDV) などが含まれる。より好ましくは、Sendai virus (SeV)、human parainfluenza virus-1 (HPIV-1)、human parainfluenza virus-3 (HPIV-3)、phocine distemper virus (PDV)、canine distemper virus (CDV)、dolphin molbillivirus (DMV)、peste-des-petits-ruminants virus (PDPR)、measles virus (MV)、rinderpest virus (RPV)、Hendra virus (Hendra)、および Nipah virus (Nipah) からなる群より選択されるウイルスが例示できる。本発明のウイルスは、好ましくはパラミクソウイル

ス亜科（レスピロウイルス属、ルプラウイルス属、およびモービリウイルス属を含む）に属するウイルスまたはその誘導体であり、より好ましくはレスピロウイルス属 (genus Respirovirus) (パラミクソウイルス属 (Paramyxovirus) とも言う) に属するウイルスまたはその誘導体である。本発明を適用可能なレスピロウイルス属ウイルスとしては、例えばヒトパラインフルエンザウイルス1型 (HPIV-1)、ヒトパラインフルエンザウイルス3型 (HPIV-3)、ウシパラインフルエンザウイルス3型 (BPIV-3)、センダイウイルス (Sendai virus; マウスパラインフルエンザウイルス1型とも呼ばれる)、およびサルパラインフルエンザウイルス10型 (SPIV-10) などが含まれる。本発明においてパラミクソウイルスは、最も好ましくはセンダイウイルスである。これらのウイルスは、天然株、野生株、変異株、ラボ継代株、および人為的に構築された株などに由来してもよい。

本発明においてベクターとは、核酸を細胞に導入する担体である。パラミクソウイルスベクターとは、パラミクソウイルスに由来する、核酸を細胞に導入する担体である。SeVなどのパラミクソウイルスは遺伝子導入ベクターとして優れており、宿主細胞の細胞質でのみ転写・複製を行い、DNAフェーズを持たないため染色体への組み込み (integration) は起こらない。このため染色体異常による癌化または不死化などの安全面における問題が生じない。パラミクソウイルスのこの特徴は、ベクター化した時の安全性に大きく寄与している。異種遺伝子発現の結果では、SeVを連続多代継代しても殆ど塩基の変異が認められず、ゲノムの安定性が高く、挿入異種遺伝子を長期間に渡って安定に発現する事が示されている (Yu, D. et al., *Genes Cells* 2, 457-466 (1997))。また、カプシド構造蛋白質を持たないことによる導入遺伝子のサイズまたはパッケージングの柔軟性 (flexibility) など性質上のメリットがある。伝播能を有するSeVベクターは、外来遺伝子を少なくとも4kbまで導入可能であり、転写ユニットを付加することによって2種類以上の遺伝子を同時に発現する事が可能である。これにより、抗体のH鎖およびL鎖を同一ベクターから発現させることができる（実施例1）。

また、センダイウイルスは齧歯類にとって病原性で肺炎を生じることが知られているが、ヒトに対しては病原性がない。これはまた、野生型センダイウイルスの経鼻的投与によって非ヒト靈長類において重篤な有害作用を示さないというこれまでの報告によても支持されている (Hurwitz, J. L. et al., *Vaccine* 15: 533-540, 1997)。更に特筆すべき利点として以下の2点、すなわち「高感染性」及び「高発現量」を挙げることができる。SeVベクターは細胞膜蛋白糖鎖のシアル酸に結合して感染するが、このシアル酸はほとんどの細胞で発現しており、このことが感染スペクトルを広くする、則ち高感染性に繋がっている。SeVのレプリコンをベースにした伝播型ベクターは放出されたウイルスが周囲の細胞にも再感染し、感染細胞の細胞質で多コピーに複製されたRNPが細胞の分裂に伴い娘細胞にも分配されるため持続発現が期待される。また、SeVベクターは非常に広い組織適用範囲を持つ。広範な感染性を有するということは、様々な種類の抗体治療（及び解析）に利用可能であることを示している。また、細胞質のみでの転写・複製するという特徴的な発現機構であることから、搭載遺伝子の発現量が非常に高いことが示されている (Moriya, C. et al., *FEBS Lett.* 425(1) 105-111 (1998); WO00/70070)。更に、エンベロープ遺伝子を欠失して非伝播性にしたSeVベクターの回収にも成功しており (WO00/70070; Li, H.-O. et al., *J. Virol.* 74(14) 6564-6569 (2000))、「高感染性」及び「高発現量」を維持して、「安全性」をさらに高めるための改良が進行している。

センダイウイルスのこれらの特徴は、SeVを始めとするパラミクソウイルスベクターは有効な遺伝子治療用および遺伝子導入用ベクターであり、抗体のインビボまたはエクスビボでの発現を目的とした遺伝子治療における有望な選択肢の一つとなることを支持するものである。特にH鎖およびL鎖を高いレベルで共発現することが可能で、ヒトに毒性がないベクターは、臨床的に高い可能性を持つ。パラミクソウイルスベクターに治療用（及び解析用）の抗体遺伝子を搭載して機能を発揮させることで、病巣近辺での局所的な高い発現が可能となり、治療効果の確

実性とともに副作用の軽減が期待される。また、モノクローナル抗体医薬の開発上必ず発生するコスト面での問題を解決する可能性も高い。これらの効果は、一過的に強発現が誘導される、SeVを初めとするパラミクソウイルスベクターだからこそ、より有効であると考えられる。

パラミクソウイルスベクターは、パラミクソウイルスのゲノムRNAを含んでいる。ゲノムRNAとは、パラミクソウイルスのウイルス蛋白質と共にRNPを形成し、該蛋白質によりゲノム中の遺伝子が発現し、該核酸が複製して娘RNPが形成される機能を持つRNAを言う。パラミクソウイルスは一本鎖ネガティブ鎖RNAをゲノムに持つウイルスであるので、このようなRNAは搭載遺伝子をアンチセンスとしてコードしている。一般にパラミクソウイルスのゲノムは、3'リーダー領域と5'トレイラーレンジの間に、ウイルス遺伝子がアンチセンスとして並んだ構成をしている。各遺伝子のORFの間には、転写終結配列(E配列) - 介在配列(I配列) - 転写開始配列(S配列)が存在し、これにより各遺伝子のORFをコードするRNAが別々のシストロンとして転写される。本発明のベクターに含まれるゲノムRNAは、該RNAにコードされる遺伝子群の発現およびRNA自身の自律的な複製に必要なウイルス蛋白質であるN(ヌクレオキヤプシド)、P(ホスホ)、およびL(ラージ)をアンチセンスにコードしている。また該RNAは、ウイルス粒子の形成に必要なM(マトリックス)蛋白質をコードしていてもよい。さらに該RNAは、ウイルス粒子の感染に必要なエンベロープ蛋白質をコードしていてもよい。パラミクソウイルスのエンベロープ蛋白質としては、細胞膜融合を起こす蛋白質であるF(フェージョン)蛋白質および細胞への接着に必要なHN(ヘマグルチニン-ノイラミニダーゼ)蛋白質が挙げられる。但し、ある種の細胞では感染にHN蛋白質は必要なく(Markwell, M. A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82(4):978-982 (1985))、F蛋白質のみで感染が成立する。また、F蛋白質および/またはHN蛋白質以外のウイルスエンベロープ蛋白質をコードさせてもよい。

本発明のパラミクソウイルスベクターは、例えばパラミクソウイルスのゲノム

RNAとウイルス蛋白質からなる複合体、すなわちリボヌクレオプロテイン (RNP) であってよい。RNPは、例えば所望のトランスフェクション試薬と組み合わせて細胞に導入することができる。このようなRNPは、具体的にはパラミクソウイルスのゲノムRNA、N蛋白質、P蛋白質、およびL蛋白質を含む複合体である。RNPは細胞内に導入されると、ウイルス蛋白質の働きによりゲノムRNAからウイルス蛋白質をコードするシストロンが転写されると共に、ゲノム自身が複製され娘RNPが形成される。ゲノムRNAの複製は、該RNAのコピー数の増加をRT-PCRまたはノーザンプロットハイブリダイゼーション等により検出することにより確認することができる。

また本発明のパラミクソウイルスベクターは、好ましくはパラミクソウイルスのウイルス粒子である。ウイルス粒子とは、ウイルス蛋白質の働きにより細胞から放出される、核酸を含む微小粒子を言う。パラミクソウイルスのウイルス粒子は、ゲノムRNAとウイルス蛋白質を含む上記RNPが細胞膜由来の脂質膜（エンベロープという）に含まれた構造をしている。ウイルス粒子は、感染性を示すものであってよい。感染性とは、パラミクソウイルスベクターが細胞への接着能および膜融合能を保持していることにより、接着した細胞の内部にベクター内部の核酸を導入することのできる能力を言う。本発明のパラミクソウイルスベクターは、伝播能を有していてもよく、あるいは伝播能を有さない欠損型ベクターであってもよい。「伝播能を有する」とは、ウイルスベクターが宿主細胞に感染した場合、該細胞においてウイルスが複製され、感染性ウイルス粒子が產生されることを指す。

例えばパラミクソウイルス亜科に属する各ウイルスにおける各遺伝子は、一般に次のように表記される。一般に、N遺伝子は"NP"とも表記される。

レスピロウイルス属 N P/C/V M F HN - L

ルプラウイルス属 N P/V M F HN (SH) L

モービリウイルス属 N P/C/V M F H - L

例えばセンダイウイルスの各遺伝子の塩基配列のデータベースのアクセスショ

ン番号は、N遺伝子については M29343, M30202, M30203, M30204, M51331, M55565, M69046, X17218、P遺伝子については M30202, M30203, M30204, M55565, M69046, X00583, X17007, X17008、M遺伝子については D11446, K02742, M30202, M30203, M30204, M69046, U31956, X00584, X53056、F遺伝子については D00152, D11446, D17334, D17335, M30202, M30203, M30204, M69046, X00152, X02131、HN遺伝子については D26475, M12397, M30202, M30203, M30204, M69046, X00586, X02808, X56131、L遺伝子については D00053, M30202, M30203, M30204, M69040, X00587, X58886を参照のこと。またその他のウイルスがコードするウイルス遺伝子を例示すれば、N遺伝子については、CDV, AF014953; DMV, X75961; HPIV-1, D01070; HPIV-2, M55320; HPIV-3, D10025; Mapuera, X85128; Mumps, D86172; MV, K01711; NDV, AF064091; PDPR, X74443; PDV, X75717; RPV, X68311; SeV, X00087; SV5, M81442; および Tupaia, AF079780、P遺伝子については、CDV, X51869; DMV, Z47758; HPIV-1, M74081; HPIV-3, X04721; HPIV-4a, M55975; HPIV-4b, M55976; Mumps, D86173; MV, M89920; NDV, M20302; PDV, X75960; RPV, X68311; SeV, M30202; SV5, AF052755; および Tupaia, AF079780、C遺伝子については CDV, AF014953; DMV, Z47758; HPIV-1, M74081; HPIV-3, D00047; MV, AB016162; RPV, X68311; SeV, AB005796; および Tupaia, AF079780、M遺伝子については CDV, M12669; DMV Z30087; HPIV-1, S38067; HPIV-2, M62734; HPIV-3, D00130; HPIV-4a, D10241; HPIV-4b, D10242; Mumps, D86171; MV, AB012948; NDV, AF089819; PDPR, Z47977; PDV, X75717; RPV, M34018; SeV, U31956; および SV5, M32248、F遺伝子については CDV, M21849; DMV, AJ224704; HPIV-1, M22347; HPIV-2, M60182; HPIV-3, X05303, HPIV-4a, D49821; HPIV-4b, D49822; Mumps, D86169; MV, AB003178; NDV, AF048763; PDPR, Z37017; PDV, AJ224706; RPV, M21514; SeV, D17334; および SV5, AB021962、HN (HまたはG)遺伝子については CDV, AF112189; DMV, AJ224705; HPIV-1, U709498; HPIV-2, D000865; HPIV-3, AB012132; HPIV-4A, M34033; HPIV-4B, AB006954; Mumps,

X99040; MV, K01711; NDV, AF204872; PDPR, Z81358; PDV, Z36979; RPV, AF132934; SeV, U06433; および SV-5, S76876 が例示できる。但し、各ウイルスは複数の株が知られており、株の違いにより上記に例示した以外の配列からなる遺伝子も存在する。

これらのウイルス蛋白質のORFは、ゲノムRNAにおいて上記のE-I-S配列を介してアンチセンスに配置される。ゲノムRNAにおいて最も3'に近いORFは、3'リーダー領域と該ORFとの間にS配列のみが必要であり、EおよびI配列は必要ない。またゲノムRNAにおいて最も5'に近いORFは、5'トレイラー領域と該ORFとの間にE配列のみが必要であり、IおよびS配列は必要ない。また2つのORFは、例えばIRES等の配列を用いて同一シストロンとして転写させることも可能である。このような場合は、これら2つのORFの間にはE-I-S配列は必要ない。野生型のパラミクソウイルスの場合、典型的なRNAゲノムは、3'リーダー領域に続き、N、P、M、F、HN、およびL蛋白質をアンチセンスにコードする6つのORFが順に並んでおり、それに続いて5'トレイラー領域を他端に有する。本発明のゲノムRNAにおいては、ウイルス遺伝子の配置はこれに限定されるものではないが、好ましくは、野生型ウイルスと同様に、3'リーダー領域に続き、N、P、M、F、HN、およびL蛋白質をコードするORFが順に並び、それに続いて5'トレイラー領域が配置されることが好ましい。ある種のパラミクソウイルスにおいては、ウイルス遺伝子は6つではないが、そのような場合でも上記と同様に各ウイルス遺伝子を野生型と同様の配置とすることが好ましい。一般にN、P、およびL遺伝子を保持しているベクターは、細胞内で自立的にRNAゲノムから遺伝子が発現し、ゲノムRNAが複製される。さらにFおよびHN遺伝子等のエンベロープ蛋白質をコードする遺伝子、およびM遺伝子の働きにより、感染性のウイルス粒子が形成され、細胞外に放出される。従って、このようなベクターは伝播能を有するウイルスベクターとなる。抗体可変領域を含むポリペプチドをコードする遺伝子は、後述するように、このゲノム中の蛋白質非コード領域に挿入すればよい。

また、本発明のパラミクソウイルスベクターは、野生型パラミクソウイルスが持つ遺伝子のいずれかを欠損したものであってよい。例えば、M、F、またはHN遺伝子、あるいはそれらの組み合わせが含まれていないパラミクソウイルスベクターも、本発明のパラミクソウイルスベクターとして好適に用いることができる。このようなウイルスベクターの再構成は、例えば、欠損している遺伝子産物を外的に供給することにより行うことができる。このようにして製造されたウイルスベクターは、野生型ウイルスと同様に宿主細胞に接着して細胞融合を起こすが、細胞に導入されたベクターゲノムはウイルス遺伝子に欠損を有するため、最初と同じような感染力を持つ娘ウイルス粒子は形成されない。このため、一回限りの遺伝子導入力を持つ安全なウイルスベクターとして有用である。ゲノムから欠損させる遺伝子としては、例えばF遺伝子および/またはHN遺伝子が挙げられる。例えば、F遺伝子が欠損した組み換えパラミクソウイルスベクターゲノムを発現するプラスミドを、F蛋白質の発現ベクターならびにNP、P、およびL蛋白質の発現ベクターと共に宿主細胞にトランスフェクションすることにより、ウイルスベクターの再構成を行うことができる（国際公開番号 W000/70055 および W000/70070；Li, H.-O. et al., J. Virol. 74(14) 6564-6569 (2000)）。また、例えば、F遺伝子が染色体に組み込まれた宿主細胞を用いてウイルスを製造することもできる。これらの蛋白質群を外から供給する場合、そのアミノ酸配列はウイルス由来の配列そのままでなくとも、核酸の導入における活性が天然型のそれと同等かそれ以上ならば、変異を導入したり、あるいは他のウイルスの相同遺伝子で代用してもよい。

また、本発明のウイルスベクターとして、ベクターゲノムが由来するウイルスのエンベロープ蛋白質とは異なる蛋白質をエンベロープに含むベクターを作製することもできる。例えば、ウイルス再構成の際に、ベクターのベースとなるウイルスのゲノムがコードするエンベロープ蛋白質以外のエンベロープ蛋白質を細胞で発現させることにより、所望のエンベロープ蛋白質を有するウイルスベクター

を製造することができる。このような蛋白質に特に制限はない。例えば、他のウイルスのエンベロープ蛋白質、例えば水疱性口内炎ウイルス (VSV) のG蛋白質 (VSV-G) を挙げることができる。本発明のウイルスベクターには、VSV-G蛋白質などのように、ゲノムが由来するウイルス以外のウイルスに由来するエンベロープ蛋白質を含むシードタイプウイルスベクターが含まれる。ウイルスのゲノムRNAにはこれらのエンベロープ蛋白質をゲノムにコードされないように設計すれば、ウイルス粒子が細胞に感染した後は、ウイルスベクターからこの蛋白質が発現されることはない。

また、本発明のウイルスベクターは、例えば、エンベロープ表面に特定の細胞に接着しうるような接着因子、リガンド、受容体等の蛋白質、抗体またはその断片、あるいはこれらの蛋白質を細胞外領域に有し、ウイルスエンベロープ由来のポリペプチドを細胞内領域に有するキメラ蛋白質などを含むものであってもよい。これにより、特定の組織を標的として感染するベクターを作り出すこともできる。これらはウイルスゲノムにコードされていてもよいし、ウイルスベクターの再構成時に、ウイルスゲノム以外の遺伝子（例えば別の発現ベクターまたは宿主染色体上などにある遺伝子）の発現により供給されてもよい。

また本発明のベクターは、例えばウイルス蛋白質による免疫原性を低下させるために、またはRNAの転写効率または複製効率を高めるために、ベクターに含まれる任意のウイルス遺伝子が野生型遺伝子から改変されていてよい。具体的には、例えばパラミクソウイルスベクターにおいては、複製因子であるN、P、およびL遺伝子の中の少なくとも一つを改変し、転写または複製の機能を高めることが考えられる。また、エンベロープ蛋白質の1つであるHN蛋白質は、赤血球凝集素であるヘマグルチニン (hemagglutinin) 活性とノイラミニダーゼ (neuraminidase) 活性との両者の活性を有するが、例えば前者の活性を弱めることができれば、血液中でのウイルスの安定性を向上させることができ、例えば後者の活性を改変することにより、感染能を調節することも可能である。また、F蛋白質を

改変することにより膜融合能を調節することもできる。また、例えば、細胞表面の抗原分子となりうるF蛋白質またはHN蛋白質の抗原提示エピトープ等を解析し、これを利用してこれらの蛋白質に関する抗原提示能を弱めたウィルスベクターを作製することもできる。

また本発明のベクターにおいては、アクセサリー遺伝子が欠損したものであつてよい。例えばSeVのアクセサリー遺伝子の1つであるV遺伝子をノックアウトすることにより、培養細胞における遺伝子発現および複製は障害されることなく、マウス等の宿主に対するSeVの病原性が顕著に減少する (Kato, A. et al., 1997, J. Virol. 71:7266-7272; Kato, A. et al., 1997, EMBO J. 16:578-587; Curran, J. et al., WO01/04272, EP1067179)。このような弱毒化ベクターは、in vivo またはex vivoにおける毒性のない遺伝子導入用ウィルスベクターとして特に有用である。

本発明のベクターは、上記のパラミクソウイルスベクターのゲノムに、抗体可変領域を含むポリペプチドをコードする核酸を有する。抗体可変領域を含むポリペプチドとしては、天然の抗体全長 (full body) であってもよく、抗原を認識する限り、抗体の可変領域を含む断片であってもよい。抗体断片としては、例えばFab、F(ab')2、または scFv などが例示できる。抗体断片をコードする核酸の挿入位置は、例えばゲノムの蛋白質非コード領域の所望の部位を選択することができ、例えば3'リーダー領域と3'に最も近いウイルス蛋白質ORFとの間、各ウイルス蛋白質ORFの間、および/または5'に最も近いウイルス蛋白質ORFと5'トレイラー領域の間に挿入することができる。また、FまたはHN遺伝子などを欠失するゲノムでは、その欠失領域に抗体断片をコードする核酸を挿入することができる。パラミクソウイルスに外来遺伝子を導入する場合は、ゲノムへの挿入断片のポリヌクレオチドの鎖長が6の倍数となるように挿入する望ましい (Journal of Virology, Vol. 67, No. 8, 4822-4830, 1993)。挿入した外来遺伝子とウイルスORFとの間には、E-I-S配列が構成されるようにする。E-I-S配列を介して2または

それ以上の遺伝子をタンデムに並べて挿入することができる。あるいは、IRESを介して目的の遺伝子を挿入してもよい。

本発明のベクターとしては、例えば抗体のH鎖可変領域を含むポリペプチド、および抗体のL鎖可変領域を含むポリペプチドをコードしていてよい。2つのポリペプチドは、互いに結合するための1つまたは複数のアミノ酸を含んでいる。例えば、野生型抗体はH鎖定常領域  $C_{H1}$  と  $C_{H2}$  の間にH鎖とL鎖がジスルフィド結合で結合するシステイン残基を持つ。このシステインを含む抗体断片をベクターから発現させることにより、H鎖とL鎖に由来するペプチド同士を結合させることができる（実施例1）。あるいは、互いに結合するタグペプチドを抗体断片に付加してもおき、このタグペプチドを介してH鎖とL鎖に由来するペプチドを結合させてもよい。天然の抗体には、さらにH鎖同士を結合させる2組のジスルフィド結合を形成させるためのシステインが各H鎖に2つ存在する。これらのうち少なくとも1つのシステインを持つH鎖は、互いに結合して2価抗体を形成する。H鎖結合のためのシステインを欠く抗体断片は、Fabのような1価の抗体を形成する。

本発明においてFabとは、抗体H鎖可変領域を含む1つのポリペプチド鎖およびL鎖可変領域を含む1つのポリペプチド鎖からなる複合体を言う。これらのポリペプチドは互いに結合し1つの抗原結合部位（1価）を形成する。Fabは、典型的にはイムノグロブリンをパパインで消化することにより得られるが、これと同等の構造を有するものも本発明においてFabと称す。具体的には、FabはイムノグロブリンL鎖と、H鎖可変領域 ( $V_H$ ) および  $C_{H1}$  を含むポリペプチド鎖とが結合した二量体蛋白質であってよい。H鎖断片のC末端部位はパパインの切断部位でなくともよく、他のプロテアーゼまたは薬剤により切断されたもの、あるいは人工的に設計した断片であってよい。Fab'（イムノグロブリンをペプシン消化後、H鎖間のジスルフィド結合を切断して得られる）、および Fab(t)（イムノグロブリンのトリプシン消化で得られる）なども、Fabと同等の構造を有することから、これらは本発明においてFabに含まれる。イムノグロブリンのクラスは限定されず、IgGおよび

IgMなどを含む全てのクラスが含まれる。Fabは、典型的にはH鎖断片およびL鎖断片のC末端付近に、両者がジスルフィド結合を介して結合できるシステイン残基を有している。しかし本発明においてFabは、ジスルフィド結合を介して結合していくなくてもよく、例えば相互に結合できるペプチド断片をL鎖とH鎖断片とに付加しておき、これらのペプチドを介して両鎖を結合させFabを形成させてもよい。

本発明においてF(ab')2とは、抗体の定常領域を欠失する抗体またはそれと同等の形態の蛋白質複合体を言い、具体的には抗体H鎖可変領域を含む1つのポリペプチド鎖およびL鎖可変領域を含む1つのポリペプチド鎖からなる複合体を2つ有する蛋白質複合体を言う。F(ab')2は抗原結合部が2つある二価抗体であり、典型的には抗体をpH 4付近でペプシンにより消化して得られ、H鎖のヒンジ領域を有している。しかし本発明においてF(ab')2は、他のプロテアーゼまたは薬剤により切断されたもの、あるいは人工的に設計したものであってよい。ペプチド鎖の結合は、ジスルフィド結合であってもよく、他の結合であってもよい。イムノグロブリンのクラスは限定されず、IgGおよびIgMなどを含む全てのクラスが含まれる。

scFvとは、抗体H鎖可変領域およびL鎖可変領域が一本のポリペプチド鎖に含まれているポリペプチドを言う。H鎖可変領域およびL鎖可変領域は適当な長さのスペーサーを介して連結されており、互いに結合して抗原結合部を形成する。

ベクターに搭載する外来遺伝子の発現レベルは、その遺伝子の上流（ネガティブ鎖の3'側）に付加する転写開始配列の種類により調節することができる（WO01/18223）。また、ゲノム上の外来遺伝子の挿入位置によって制御することができ、ネガティブ鎖の3'の近くに挿入するほど発現レベルが高く、5'の近くに挿入するほど発現レベルが低くなる。このように、外来遺伝子の挿入位置は、該遺伝子の所望の発現量を得るために、また前後のウィルス蛋白質をコードする遺伝子との組み合わせが最適となる様に適宜調節することができる。一般に、抗体断片の高い発現が得られることが有利と考えられるため、抗体をコードする外来遺伝子は、効率の高い転写開始配列に連結し、ネガティブ鎖ゲノムの3'端近くに挿

入することが好ましい。具体的には、3'リーダー領域と3'に最も近いウイルス蛋白質ORFとの間に挿入される。あるいは、3'に一番近いウイルス遺伝子と2番目の遺伝子のORFの間に挿入してもよい。野生型パラミクソウイルスにおいては、ゲノムの3'に最も近いウイルス蛋白質遺伝子はN遺伝子であり、2番目の遺伝子はP遺伝子である。逆に、導入遺伝子の高発現が望ましくない場合は、例えばベクターにおける外来遺伝子の挿入位置をネガティブ鎖ゲノムのなるべく5'側に設定したり、転写開始配列を効率の低いものにするなどして、ウィルスベクターからの発現レベルを低く抑えることで適切な効果が得られるようにすることも可能である。

H鎖可変領域を含むポリペプチドおよびL鎖可変領域を含むポリペプチドの2本のポリペプチドをベクターから発現させる場合は、それぞれのポリペプチドをコードする核酸をベクターのゲノムに挿入する。2つの核酸はE-I-S配列を介してタンデムに並べることが好ましい。S配列は転写開始効率の高い配列を用いることが好ましく、例えば 5'-CTTCACCCCT-3' (ネガティブ鎖、配列番号: 1) を好適に用いることができる。

本発明のベクターは、このように抗体断片をコードする遺伝子を挿入した以外の位置に他の外来遺伝子を保持していてもよい。このような外来遺伝子としては制限はない。例えばベクターの感染をモニターするためのマーカー遺伝子であってもよく、あるいは免疫系を調節するサイトカイン、ホルモン、その他の遺伝子であってもよい。本発明のベクターは、生体における標的部位への直接 (in vivo) 投与、および患者由来細胞またはそれ以外の細胞に本発明のベクターを導入し、その細胞を標的部位へ注入する間接 (ex vivo) 投与により遺伝子を導入することができる。

本発明のベクターに搭載される抗体は、宿主の可溶性蛋白質、膜蛋白質、構造蛋白質、酵素などに対する抗体であってよい。好ましくは、シグナル伝達に関与する分泌性蛋白質、その受容体、または細胞内シグナル伝達分子などに対する抗体が挙げられる。例えば受容体の細胞外領域に対する抗体、または受容体のリガ

ンドに対する抗体（例えばリガンドの受容体結合部位に対する抗体）が挙げられる。この抗体を発現するベクターを投与することにより、リガンドと受容体との結合が阻害され、この受容体を介したシグナル伝達を遮断することができる。特に本発明のベクターに搭載させる抗体としては、疾患または傷害に対して治療効果を有する抗体が好ましい。抗体遺伝子を搭載した遺伝子導入ベクターについて、幾つかの報告がなされている。そのほとんどは、ベクターのターゲッティング（targeting）を目的としたものである。例えばレトロウイルス（Somia, N.V. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92(16) 7570-7574 (1995); Marin, M. et al., J. Virol. 70(5) 2957-2962 (1996); Chu, T.H. & Dornburg, R., J. Virol. 71(1) 720-725 (1997); Ager, S. et al., Hum. Gene Ther. 7(17) 2157-2167 (1997); Jiang, A. et al., J. Virol. 72(12) 10148-10156 (1998); Jiang, A. & Durnburg, R. Gene Ther. 6(12) 1982-1987 (1999); Kuroki, M. et al., Anticancer Res. 20(6A) 4067-4071 (2000); Pizzato, M. et al., Gene Ther. 8(14) 1088-1096 (2001); Khare, P.D. et al., Cancer Res. 61(1) 370-375 (2001)）、アデノウイルス（Douglas, J.T. et al., Nat. Biotechnol. 14(11) 1574-1578 (1996); Curiel, D.T. Ann. NY Acad. Sci. 886 158-171 (1999); Haisma, H.J. et al., Cancer Gene Ther. 7(6) 901-904 (2000); Yoon, S.K. et al., Biochem Biophys. Res. Commun. 272(2) 497-504 (2000); Kashentseva, E.A. et al., Cancer Res. 62(2) 609-616 (2002)）、アデノ随伴ウイルス（AAV）（Bartlett, J.S. et al., Nat. Biotechnol. 17(4) 393 (1999)）、MVA（Paul, S. et al., Hum. Gene Ther. 11(10) 1417-1428 (2000)）、及び麻疹ウイルス（Hammond, A.L. J. Virol. 75(5) 2087-2096 (2001)）等でターゲッティングを目的として抗体遺伝子を搭載した遺伝子導入ベクターの実施例が報告されている。ほとんどのケースでsingle-chain antibody (scFv) を利用しており、また癌細胞へのターゲッティング例が多い。本発明のベクターを利用して、これらの抗体をエンベロープ表面に持つパラミクソウイルスを作製すれば、特定

の細胞に感染するターゲッティングベクターを構築することも可能である。例えば interleukin(IL)-6 または fibroblast growth factor (FGF) などの炎症性サイトカインに対する抗体遺伝子を搭載させることで、本発明のベクターを慢性関節リウマチ (RA) などの自己免疫疾患および癌などのターゲッティングベクターとして使用することができる。自殺遺伝子または癌ワクチン蛋白質を発現するこれらのターゲッティングベクターを用いた癌治療への応用が期待される。

しかしながら本発明のベクターは、上記のようなターゲッティング以外の用途へ適用することができる点でも優れている。例えば本発明は、疾患または傷害に対して治療効果を有する抗体をコードするパラミクソウイルスベクターを提供する。これまでに、例えばアデノウイルスベクターに抗erbB-2のscFv遺伝子を intrabody (細胞内で機能する抗体) として搭載し、癌治療を目的とした例 (Kim, M. et al., Hum. Gene Ther. 8(2) 157-170 (1997); Deshane, J. et al., Gynecol. Oncol. 64(3) 378-385 (1997)) について臨床研究が行われている (Alvarez, R. D. & Curiel, D. T. Hum. Gene Ther. 8(2) 229-242 (1997); Alvarez, R. D. et al., Clin. Cancer Res. 6(8) 3081-3087 (2000))。同様の癌治療へ向けたアデノウイルスベクターのscFv遺伝子に関しては、同じ抗erbB-2を intrabodyではなく分泌型で検討した例 (Arafat, W. O. et al., Gene Ther. 9(4) 256-262 (2002))、抗4-1BB (T cell activation molecule) で検討した例 (Hellstrom, Y. Z. et al., Nat. Med. 8(4) 343-348 (2002))、及び抗CEA (carcino-embryonic antigen) で検討した例 (Whittington, H. A. et al., Gene Ther. 5(6) 770-777 (1998)) 等が報告されている。これらは主にscFvを利用したものである。本発明のベクターを利用して、これらの抗体をコードするパラミクソウイルスを作製すれば、インビボで投与できる治療用ウイルスベクターとして有用である。本発明のベクターは宿主染色体に組み込まれないため安全であり、通常、搭載遺伝子を数日～数週間以上にわたって発現可能であるため、種々の疾患または傷害の治療のために適用される。また本発明のベクターは、上記のよう

なscFvのみならず、Fab、F(ab')2、またはfull body（全長抗体）といった多量体を発現させるためにH鎖とL鎖の両鎖の遺伝子を搭載でき、これにより複数の鎖を含む抗体複合体を産生することができる点で極めて優れている。Fabまたは抗体のfull body（全長抗体）などを構成するH鎖およびL鎖またはそれらの断片をコードするベクターは、scFvを発現するベクターよりも高い治療効果を期待することができる。

本発明のベクターは、上記に例示したような癌に対する適用以外にも、さまざまな用途が想定される。例えば癌以外の疾患に対しては、HIVの治療を目的として、抗REV、抗gp120或いは抗integraseをターゲットにして、レトロウイルスベクター（Ho, W. Z. et al., AIDS Res. Hum. Retroviruss 14(17) 1573-1580 (1998)）、AAVベクター（Inouye, R. T. et al., J. Virol. 71(5) 4071-4078 (1997)）、SV40（BouHamdan, M. et al., Gene Ther. 6(4) 660-666 (1999)）或いはプラスミド（Chen, S. Y. et al., Hum. Gene Ther. 5(5) 595-601 (1994)）での検討が報告されている。上記例は全てscFvを利用している。他の感染症に対しても、抗狂犬病ウイルス（rabies virus）抗体のfull bodyを狂犬病ウイルスのワクチン株に搭載した例（Morimoto, K. et al., J. Immunol. Methods 252(1-2) 199-206 (2001)）、及び抗シンドビスウイルス（Sindbis virus）抗体のfull bodyをH鎖とL鎖を別個のシンドビスウイルスに搭載した例（Liang, X. H. Mol. Immunol. 34(12-13) 907-917 (1997)）が報告されている。後者2例に関しては、抗体のfull bodyをウイルスベクターに搭載し、活性型として大量に分泌することに成功している。但し、両報告は共にモノクローナル抗体の生産系に関するものであり、感染症治療のために直接ベクターを投与することに関しては全く想定されていない。安全性等の観点からも、実際に治療用として投与して *in vivo*（臨床応用）で局所的に高発現させることは期待できない。これに対して本発明のベクターは、抗体の製造における使用、および遺伝子治療における使用の両面で好適に使用できる点でも優れている。本発明のベクターは、特にヒトに対して病原性がな

いことから、ヒトを対象とする安全性の高い遺伝子治療用の抗体遺伝子搭載ベクターとして高い有用性を持っている。本発明のベクターを治療用として局所投与すれば、*in vivo* (臨床応用) での局所的な高発現を期待できる。

特に本発明のベクターから発現させるのに有用な抗体は、細胞内外のシグナル伝達に関する分子に対する抗体である。中でも、神経の生存、分化、または神経突起伸長 (axonal elongation) を抑制するリガンドまたは受容体に対する抗体は、本発明において好適に適用される。このようなシグナル分子としては、NOGOなどの神経伸長阻害因子が挙げられる。神経伸長阻害因子に対する抗体を発現するベクターは、神経損傷に対する新しい遺伝子治療を可能にする。

多くの組織は損傷後も自己再生能力を有しており、神経系でも末梢神経は切断或いは坐滅等の損傷後も、軸索が進展し再生可能である。しかしながら、脳および脊髄等の中核神経系の神経細胞は、損傷後の軸索の進展は観察されず、再生能を有さない (Ramon y Cajal S, New York: Hafner (1928); Schwab, M. E. and Bartholdi, D. *Physiol. Rev.* 76, 319-370 (1996))。しかし、中核神経系の神経細胞でも末梢に移植すると軸索の進展が生じることが示されたことから (David, S. and Aguayo, A. J. *Science* 214, 931-933 (1981))、中核神経系の神経細胞も元来は軸索の再生能を有しているが、中核神経系の環境が軸索の進展を阻害している、則ち中核神経系には神経細胞の再生 (軸索の進展) を阻害する因子が存在すると予想された。

そして実際に、その一つとしてNOGOが同定された (Prinjha, R. et al., *Nature* 403, 383-384 (2000); Chen, M. S. et al., *Nature* 403, 434-439 (2000); GrandPre, T. et al., *Nature* 403, 439-444 (2000))。NOGOはNogo-A (Ac. No. AJ242961, (CAB71027)), Nogo-B (Ac. No. AJ242962, (CAB71028)) 及び Nogo-C (Ac. No. AJ242963, (CAB71029)) の3つのisoformが知られており splice variantsであると予想されている。軸索進展阻害活性は最も大きなNogo-A (分子量約250 kDa) が強いが、活性部位は、3種全てに共通に存在している66アミノ

酸の細胞外ドメインであると予想されている (GrandPre, T. et al., *Nature* 403, 439-444 (2000))。従って、Nogo-A、Nogo-B、またはNogo-Cに結合する抗体をコードするパラミクソウイルスベクターは、神経形成を促進するために好適に用いることができる。このNOGOに対するモノクローナル抗体としてIN-1が知られている。IN-1はオリゴデンドロサイト及びミエリンによる軸索進展の阻害を *in vitro* で中和すると報告されており (Caroni, P. and Schwab, M.E. *Neuron* 1, 85-96 (1988))、更には、機械的に脊髄損傷を生じさせるラットの *in vivo* モデルにおいて、損傷部位にIN-1を投与することにより、5%の軸索が損傷部位を越えて進展し、著しい機能回復が達成されたことが報告されている (Bregman, B.S. et al., *Nature* 378, 498-501 (1995))。このように、中枢神経において軸索進展阻害活性を有する生体内の因子に対する中和抗体は、中枢神経系の神経細胞再生に有効な可能性が高い。NOGO以外に類似活性（軸索進展阻害活性）を有する因子としては、Semaphorin、ephrin及びSlit等 (Semaphorin: Genbank Ac. Nos. NM\_006080 (protein: NP\_006071), L26081 (AAA65938); Ephrin: Ac. Nos. NM\_001405 (NP\_001396), NM\_005227 (NP\_005218), NM\_001962 (NP\_001953), NM\_004093 (NP\_004084), NM\_001406 (NP\_001397); Slit: Ac. Nos. AB017167 (BAA35184), AB017168 (BAA35185), AB017169 (BAA35186)) が知られており (Chisholm, A. and Tessier-Lavigne, M. *Curr. Opin. Neurobiol.* 9, 603-615 (1999))、それぞれの役割が異なるにせよ、これらの因子に対する抗体は、再生しないと言われていた中枢神経においても軸索の進展を可能にし、IN-1で示されている脊髄損傷に限らず、種々の神経変性疾患に応用出来る可能性を有している。

また、NOGOと同様の軸索伸長阻害活性を持つ因子である myelin-associated glycoprotein (MAG) (ACCESSION NM\_002361 (NP\_002352), NM\_080600 (NP\_542167), Aboul-Enein, F. et al., *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 62 (1), 25-33 (2003); Schnaar, R.L. et al., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 845, 92-105

(1998); Spagnol, G. et al., *J. Neurosci. Res.* 24 (2), 137-142 (1989); Sato, S. et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 163 (3), 1473-1480 (1989); Attia, J. et al., *Clin. Chem.* 35 (5), 717-720 (1989); Quarles, R.H., *Crit Rev Neurobiol* 5 (1), 1-28 (1989); Barton, D.E. et al., *Genomics* 1 (2), 107-112 (1987); McKerracher L et al. (1994) Identification of myelin-associated glycoprotein as a major myelin-derived inhibitor of neurite growth. *Neuron* 13:805-811; Mukhopadhyay G et al. (1994) A novel role for myelin associated glycoprotein as an inhibitor of axonal regeneration. *Neuron* 13:757-767; Tang S et al. (1997) Soluble myelin-associated glycoprotein (MAG) found in vivo inhibits axonal regeneration. *Mol Cell Neurosci* 9:333-346、NOGOおよびMAGの共通の受容体であるNogo receptor (Nogo-66 receptor) (ACCESSION NM\_023004 (NP\_075380, Q9BZR6), Josephson, A., et al., *J. Comp. Neurol.* 453 (3), 292-304 (2002); Wang, K. C., et al., *Nature* 420 (6911), 74-78 (2002); Wang, K. C. et al., *Nature* 417 (6892), 941-944 (2002); Fournier, A. E. et al., *Nature* 409 (6818), 341-346 (2001); Dunham, I., et al., *Nature* 402 (6761), 489-495 (1999); Strausberg, R. L. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99 (26), 16899-16903 (2002); GrandPre, T. et al., *Nature* 417 (6888), 547-551 (2002); Liu, B. P. et al., *Science* 297 (5584), 1190-1193 (2002); Woolf, C. J. and Bloechlinger, S., *Science* 297 (5584), 1132-1134 (2002); Ng, C. E. and Tang, B. L., *J. Neurosci. Res.* 67 (5), 559-565 (2002))、軸索伸長に阻害作用を及ぼすコンドロイチン硫酸プロテオグリカン (CSPG) などのグリア周辺の細胞外マトリクス (Rudge JS, Silver J (1990) Inhibition of neurite outgrowth on astroglial scars in vitro. *J Neurosci* 10:3594-3603; McKeon RJ, et al. (1999) The chondroitin sulfate proteoglycans neurocan and phosphacan are expressed by reactive astrocytes in the chronic CNS glial scar. *J Neurosci* 19:10778-10788;

Smith-Thomas LC et al. (1995) Increased axon regeneration in astrocytes grown in the presence of proteoglycan synthesis inhibitors. *J Cell Sci* 108:1307-1315; Davies SJA, et al. (1997) Regeneration of adult axons in white matter tracts of the central nervous system. *Nature* 390:680-683; Fidler PS et al. (1999) Comparing astrocytic cell lines that are inhibitory or permissive for axon growth: the major axon-inhibitory proteoglycan is NG2. *J Neurosci* 19:8778-8788)、特にNG2 (Levine JM et al. (1993) Development and differentiation of glial precursor cells in the rat cerebellum. *Glia* 7:307-321)、neurocan (Asher RA et al. (2000) Neurocan is upregulated in injured brain and in cytokine-treated astrocytes. *J Neurosci* 20:2427-2438; Haas CA et al. (1999) Entorhinal cortex lesion in adult rats induces the expression of the neuronal chondroitin sulfate proteoglycan neurocan in reactive astrocytes. *J Neurosci* 19:9953-9963)、phosphacan (McKeon RJ et al. (1999) The chondroitin sulfate proteoglycans neurocan and phosphacan are expressed by reactive astrocytes in the chronic CNS glial scar. *J Neurosci* 19:10778-10788)、versican (Morven C et al., *Cell Tissue Res* (2001) 305:267-273)などに対する抗体も有用である (Genbank Ac. Nos. NM\_021948 (protein NP\_068767), NM\_004386 (protein NP\_004377)) (McKerracher L and Ellezam B. (2002) Putting the brakes on regeneration. *Science* 296, 1819-20; McKerracher L and Winton MJ (2002) Nogo on the go. *Neuron* 36, 345-8)。

それぞれの因子間での役割が明らかになるに従って、それぞれの神経変性疾患により適合するリガンドが選択され、その因子に対する抗体が特定の神経変性疾患に利用されるようになるかも知れない。

例えば、これらの抗体遺伝子を搭載したパラミクソウイルスベクターについて

脊髄損傷への治療応用を想定した場合、ベクターを損傷部位へ直接投与する方法が可能である。また当該ベクターは発現量が非常に高いことから、損傷部位近傍の脊髄腔内への投与も可能であると予想される。また、損傷を受け軸索が変性した後に、再生のフェーズになるまでには数日間が必要であることから、投与を判断するまでの時間的余裕もあると考えられ、更には損傷直後は変性に伴う炎症反応が盛んに生じることから、実際には損傷数日後、具体的には3日～10日後に投与する可能性が高い。また、当該の軸索進展阻害活性を有する因子に対する中和抗体遺伝子のみではなく、積極的に軸索進展を促進する因子の遺伝子を搭載したベクター、蛋白或いは類似活性を有する化合物との併用を想定することもできる。軸索進展を促進する因子としては、glial cell-derived neurotrophic factor (GDNF) 等の神経栄養因子を挙げることができる。

また本発明は、免疫反応を抑制する抗体の可変領域を含むポリペプチドをコードするパラミクソウイルスベクターに関する。本発明者らは、免疫反応を抑制する抗体遺伝子を搭載することで、ベクター自身が有する免疫原的な性質を減弱することが可能であることを見出した。例えば免疫細胞の補助刺激因子に対する抗体またはその受容体に対する抗体を発現するベクターを用いて、補助刺激因子によるシグナル伝達を抑制することにより免疫系活性化を抑制し、ベクターからの搭載遺伝子の長期発現が可能となる。このような改変ベクターは、生体への遺伝子導入用ベクターとして特に有用である。抗体により阻害する対象となる分子としては、免疫活性化シグナルを伝達する所望のシグナル分子が挙げられ、増殖因子またはサイトカインなどの液性因子または受容体であつてよい。

ウィルスに対する生体防御機構は複雑で何重にも防御されていることが知られている。このことは生体防御という観点からはなくてはならない重要なシステムであるが、ウィルスベクターを利用した遺伝子治療という観点からは回避したい項目である。その一つが、RNAウィルスの感染依存的に生成する二本鎖RNAにより活性化されると言われているInterferon regulatory factor 3 (IRF-3 : Lin, R.

et al., Mol. Cell. Biol. 18(5) 2986-2996 (1998); Heylbroeck, C. et al., J. Virol. 74(8) 3781-3792 (2000), Genbank Ac. No. NM\_001571 (protein NP\_001562) 及びdouble-stranded RNA-activated protein kinase (PKR : Der, S.D. & Lau, A.S. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 92, 8841-8845 (1995); Dejucq, N. et al., J. Cell. Biol. 139(4) 865-873 (1997), Genbank Ac. No. AH008429 (protein AAF13156)) 等の活性化であり、その下流の転写因子を活性化しInterferon (IFN) 等の発現を亢進する。例えば、intrabodyのような細胞内で機能する形で、IRF-3或いはPKRの活性を抑制する抗体をベクターに搭載すれば、自然免疫反応の一部を抑制し感染の持続化による搭載遺伝子の持続的発現が出来る可能性がある。実際に、PKRのantisenseを高発現しPKR活性を抑制した細胞においては、少なくともin vitroレベルでのencephalomyocarditis virusの持続的感染が生じることが示されている (Yeung, M.C. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 96(21) 11860-11865 (1999))。また、Toll-like receptor (TLR) ファミリーの中の、TLR-3がdouble-stranded RNAを認識してウィルス感染による自然免疫を発動することが示されており (Alexopoulou, L. et al., Nature 413, 732-738 (2001))、TLR-4もrespiratory syncytial virus感染による同作用への関わりが示されている (Haynes, L.M. et al., J. Virol. 75(22) 10730-10737 (2001))。これら TLR-3或いはTLR-4 (TLR-3: Genbank Ac. No. NM\_003265 (protein NP\_003256); TLP-4: Genbank Ac. No. AH009665 (protein AAF89753))に対する中和抗体もウィルスベクターによる持続発現に寄与する可能性がある。

同様に、ウィルスベクターの免疫原的な性質を減弱することを目的として、臓器移植で試みられている方法を応用することも可能である。則ち、末梢性の免疫寛容を目的とした抗体遺伝子の搭載である。T細胞の活性化に関して次のようなモデルが提唱されている (Schwartz, R.H. et al., Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 2, 605-610 (1989))。休止期のT細胞の活性化にはT細胞受容体 (TCR)、抗原、及び組織適合性抗原 (MHC) に由来するシグナルに加えて、第二のシ

グナルであるコスティミュラトリーシグナル (co-stimulatory signal; 補助刺激) が必要であり、第二のシグナルが欠如した状態で抗原刺激が起きるとT細胞の不活化から寛容が誘導されるというものである。もし、この様式でウィルスベクター感染細胞の免疫寛容が誘導されれば、他への免疫反応を抑制することなく、ウィルスベクターに対してのみ免疫反応を回避することが出来るようになり、理想的な手法となり得る。T細胞上の補助刺激因子としてCD28 (Ac. No. J02988 (protein AAA60581), AF222341 (AAF33792), AF222342 (AAF33793), AF222343 (AAF33794)) が同定されており、抗原提示細胞上のCD80 (Ac. No. NM\_005191 (NP\_005182)), CD86 (Ac. No. U04343 (AAB03814), NM\_006889 (NP\_008820)) と相互作用することによりTCRからの刺激を増幅させ、IL-2などの産生によりT細胞を更に活性化する。一方、CTLA-4 (cytotoxic T lymphocyte antigen 4 : CD152) (Ac. No. L15006, (AAB59385)) はCD28と共通のリガンド (CD80, CD86) に高親和性で結合し、T細胞を抑制する作用がある (Walunas, T.L. et al., *Immunity* 1(5) 405-413 (1994))。同様の活性化リガンドとしてPD-1L、およびその受容体PD-1が知られている (PD-1: Genbank Ac. No. U64863 (protein AAC51773), PD-1L: AF233516 (protein AAG18508; 本明細書においてはこれらをPD-1と総称する)) (Finger, L.R. et al., *Gene* 197, 177-187 (1997); Freeman, G. J. et al., *J. Exp. Med.* 192, 1027-1034 (2000))。また、T細胞上のLymphocyte Function-associated Antigen-1 (LFA-1) (Ac. No. Y00057 (CAA68266)) は抗原提示細胞上のInter Cellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1 : CD54) (Ac. No. J03132 (AAA52709), X06990 (CAA30051)) と結合し、同様に補助刺激に関わっていると言われている。以上の観点から、CD28を抑制する抗体及びCTLA-4の活性をmimicする抗体遺伝子、および/またはLFA-1とICAM-1間の結合を阻害する抗体遺伝子を搭載したウィルスベクターは、感染細胞における末梢性免疫寛容を獲得し、長期の遺伝子発現または複数回投与を達成する可能性があると予想される。実際に、臓器移植の場合の検討において、該当する抗体の短期投

与によって寛容が誘導出来ることが示されている。例えば、補助刺激因子である CD28 の結合を阻害する抗 CD28 抗体を利用した効果 (Yu, X.Z. et al., J. Immunol. 164(9) 4564-4568 (2000); Laskowski, I.A. et al., J. Am. Soc. Nephrol. 13(2) 519-527 (2002))、逆に T 細胞活性化に対して抑制的に機能する CTLA-4 そのものを IgG1 Fc に結合した蛋白 (CTLA4-Ig) を利用した効果 (Pearson, T.C. et al., Transplantation 57(12) 1701-1706 (1994); Blazzer, B.R. et al., Blood 85(9) 2607-2618 (1995); Hakim, F.T. et al., J. Immunol. 155(4) 1757-1766 (1995); Gainer, A.L. et al., Transplantation 63(7) 1017-1021 (1997); Kirk, A.D. et al., Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A. 94(16) 8789-8794 (1997); Comoli, P. et al., Bone Marrow Transplant 27(12) 1263-1273 (2001))、LFA-1 と ICAM-1 間の結合を阻害する抗体を利用した効果 (Heagy, W. et al., Transplantation 37(5) 520-523 (1984); Fischer, A. et al., Blood 77(2) 249-256 (1991); Guerette, B. et al., J. Immunol. 159(5) 2522-2531 (1997); Nicolls, M.R. et al., J. Immunol. 164(7) 3627-3634 (2000); Poston, R.S. et al., Transplantation 69(10) 2005-2013 (2000); Morikawa, M. et al., Transplantation 71(11) 1616-1621 (2001); Da Silva, M. et al., J. Urrol. 166(5) 1915-1919 (2001)) 等多くの報告がなされている。更には、CD28 および CTLA4 と構造的・機能的な類似性があり最近同定された inducible costimulator (ICOS : Wallin, J.J. et al., J. Immunol. 167(1) 132-139 (2001); Sperling, A.I. & Bluestone, J.A. Nat. Immunol. 2(7) 573-574 (2001); Ozkaynak, E. et al., Nat. Immunol. 2(7) 591-596 (2001); Ac. No. AJ277832 (CAC06612)) についても同様の検討がなされており、抗 ICOS 抗体での効果が確認されている (Ogawa, S. et al., J. Immunol. 167(10) 5741-5748 (2001); Guo, L. et al., Transplantation 73(7) 1027-1032 (2002))。ウィルスベクターを利用した方法においても報告があり、臓器移植の時に CTLA4-Ig 遺伝子搭載アデノウィルスベクターの応用検討がなされている (Pearson, T.C. et

al., Transplantation 57(12) 1701-1706 (1994); Li, T.S. et al., Transplantation 72(12) 1983-1985 (2001))。

以上のような臓器移植の場面での末梢性免疫寛容を目的とした手法は、遺伝子導入用ウィルスベクター利用時においても、免疫寛容を誘導する有効な手法としてそのまま応用することが可能であり、該当する抗体遺伝子（或いはCTLA4-Ig）の搭載によって長期遺伝子発現或いは繰り返し投与を実現することができる。この観点ではアデノウィルスベクターについて報告がなされており、CTLA4-Ig遺伝子を搭載したアデノウィルスベクターを、別のマーカー遺伝子（lacZ）を搭載したベクターと同時に投与することで、免疫反応が抑制され、マーカー遺伝子の発現が延長されることが示されている（Ali, R.R. et al., Gene Ther. 5(11) 1561-1565 (1998); Ideguchi, M. et al., Neuroscience 95(1) 217-226 (2000); Uchida, T. et al., Brain Res. 898(2) 272-280 (2001)）。この系では唯一、CTLA4-Ig遺伝子を用いており、マーカー遺伝子は別のベクターへ搭載した単純な系での検討であり、同じベクターに搭載した例、他の補助刺激因子を抗体遺伝子で抑制した例、また特にパラミクソウイルスベクターでの効果を見た例は無く、詳細な検討はなされていない。本発明においては、上記のような種々のシグナル分子に対する抗体遺伝子を用いてよく、さらに免疫寛容を誘導する抗体遺伝子と治療遺伝子（またはマーカー遺伝子）などの複数の遺伝子を单一ベクターから発現させることができる。特にT細胞活性化の補助刺激因子の作用を抑制する抗体遺伝子を用いることにより、例えば投与部位局所の免疫系に限局して作用する長期遺伝子発現および繰り返し（複数回）投与が可能なベクターを構築することができる。

これらの因子または受容体に対する抗体遺伝子を搭載したパラミクソウイルスベクターは、さらに治療用遺伝子を搭載させ治療用ベクターとして用いられる。あるいは、治療遺伝子を搭載した別のベクターとともに投与することにより、治療遺伝子の長期発現および／または繰り返し投与を可能にする。疾患としては遺

伝子治療の対象となりうる任意の疾患が挙げられる。ベクターの投与方法などについては、それぞれの治療用遺伝子を用いた遺伝子治療に則った治療方法を適用すればよい。

免疫寛容を誘導する抗体をコードする本発明のベクターは、この抗体をコードしない対照ベクターに比べ、投与後の生体における発現の持続性が上昇している。発現の持続性は、例えば本発明のベクターと対照ベクターとを同じ力価で同じ部位（例えば左右対称の部位）に投与し、投与直後を100とした時の相対発現レベルの経時的変化を測定することにより評価することができる。例えば投与後に、相対発現レベルが50、30、または10となるまでの期間、あるいは投与から一定期間後の相対発現レベルを測定すればよい。本発明のベクターは、対照に比べ統計学的有意（例えば有意水準5%またはさらに有意）に発現持続性が上昇している。統計学的解析は、例えばt検定などにより行うことができる。

また、このとき、コスティミュラトリーシグナルのシグナル分子に対する抗体、あるいはCTLA4またはその断片を投与することによって、ベクターからの遺伝子発現の持続性をさらに延長させることができる。コスティミュラトリーシグナルのシグナル分子に対する抗体としては上記したCD28、CD80、CD86、LFA-1、ICAM-1 (CD54)、または ICOS などに対する抗体を用いることができる。このような抗体断片は、例えば「日本生化学会編 新生化学実験講座12 分子免疫学III 185-195ページ（東京化学同人）」および/または「Current Protocols in Immunology, Volume 1, (John Wiley & Sons, Inc.)」の記載に従って作製することができる。抗体断片は、例えば抗体をペプシン、パパイン、トリプシン等の蛋白質分解酵素で消化することにより得ることができる。あるいは可変領域のアミノ酸配列を解析し、組み換え蛋白質として発現させ調製することが可能である。また抗体には、ヒト型抗体もしくはヒト抗体なども含まれる。抗体は、プロテインAカラムまたはプロテインGカラム等を用いたアフィニティーコロマトグラフィーにより精製することができる。CTLA4またはその断片としては、CTLA4の

CD80/CD86結合部位を含み、CD80および/またはCD86と結合してCD28との相互作用を阻害するポリペプチドであれば所望のポリペプチドを用いることができるが、例えばCTLA4の細胞外ドメインにIgG（例えばIgG1）のFc断片を融合させた可溶性ポリペプチドを好適に用いることができる。これらのポリペプチドおよび抗体は、凍結乾燥して製剤化したり、あるいは所望の薬学的に許容される担体、具体的には生理食塩水またはリン酸緩衝生理食塩水（PBS）などと共に水性組成物とすることができる。本発明は、これらのポリペプチドまたは抗体、および本発明のベクターを含む遺伝子導入キットに関する。このキットは、ベクターの投与後の発現期間を延長するために使用することができる。特に繰り返し投与におけるベクターからの遺伝子発現の持続性を上昇させるために使用される。

本発明のベクターを製造するには、哺乳動物細胞においてパラミクソウイルスのゲノムRNAを含むRNPの再構成に必要なウイルス蛋白質、すなわちN、P、およびL蛋白質の存在下、本発明のパラミクソウイルスのゲノムRNAをコードするcDNAを転写させる。転写によりネガティブ鎖ゲノム（すなわちウイルスゲノムと同じアンチセンス鎖）を生成させてもよく、あるいはポジティブ鎖（ウイルス蛋白質をコードするセンス鎖）を生成させても、ウイルスRNPを再構成することができる。ベクターの再構成効率を高めるには、好ましくはポジティブ鎖を生成させる。RNA末端は、天然のウイルスゲノムと同様に3'リーダー配列と5'トレイラー配列の末端をなるべく正確に反映させることが好ましい。転写産物の5'端を正確に制御するためには、例えば転写開始部位としてT7 RNAポリメラーゼ認識配列を利用し、該RNAポリメラーゼを細胞内で発現させればよい。転写産物の3'端を制御するには、例えば転写産物の3'端に自己切断型リボザイムをコードさせておき、このリボザイムにより正確に3'端が切り出されるようにすることができる（Hasan, M. K. et al., J. Gen. Virol. 78: 2813-2820, 1997, Kato, A. et al., 1997, EMBO J. 16: 578-587 及び Yu, D. et al., 1997, Genes Cells 2: 457-466）。

例えば外来遺伝子を有する組み換えセンダイウイルスベクターは、Hasan, M.

K. et al., J. Gen. Virol. 78: 2813-2820, 1997, Kato, A. et al., 1997, EMBO J. 16: 578-587 及び Yu, D. et al., 1997, Genes Cells 2: 457-466の記載等に準じて、次のようにして構築することができる。

まず、目的の外来遺伝子のcDNA塩基配列を含むDNA試料を用意する。DNA試料は、25ng/ $\mu$ l以上濃度で電気泳動的に单一のプラスミドと確認できることが好ましい。以下、NotI部位を利用してウイルスゲノムRNAをコードするDNAに外来遺伝子を挿入する場合を例にとって説明する。目的とするcDNA塩基配列の中にNotI認識部位が含まれる場合は、部位特異的変異導入法などを用いて、コードするアミノ酸配列を変化させないように塩基配列を改変し、NotI部位を予め除去しておくことが好ましい。この試料から目的の遺伝子断片をPCRにより増幅し回収する。2つのプライマーの5'部分にNotI部位を付加しておくことにより、増幅された断片の両端をNotI部位とする。ウイルスゲノム上に挿入された後の外来遺伝子のORFとその両側のウイルス遺伝子のORFとの間にE-I-S配列が1つずつ配置されるように、プライマー中にE-I-S配列またはその部分を含めるようにする。

例えば、フォワード側合成DNA配列は、NotIによる切断を保証するために5'側に任意の2以上のヌクレオチド（好ましくはGCGおよびGCCなどのNotI認識部位由来の配列が含まれない4塩基、更に好ましくはACTT）を選択し、その3'側にNotI認識部位gcggccgcを付加し、さらにその3'側にスペーサー配列として任意の9塩基または9に6の倍数を加えた数の塩基を付加し、さらにその3'側に所望のcDNAの開始コドンATGからこれを含めてORFの約25塩基相当の配列を付加した形態とする。最後の塩基はGまたはCとなるように該所望のcDNAから約25塩基を選択してフォワード側合成オリゴDNAの3'の末端とすることが好ましい。

リバース側合成DNA配列は5'側から任意の2以上のヌクレオチド（好ましくはGCGおよびGCCなどのNotI認識部位由来の配列が含まれない4塩基、更に好ましくはACTT）を選択し、その3'側にNotI認識部位gcggccgcを付加し、さらにその3'側に長さを調節するための挿入断片のオリゴDNAを付加する。このオリゴDNAの長さ

は、付加したE-I-S配列を含む最終的なPCR増幅産物のNotI断片の鎖長が6の倍数になるように塩基数を設計する（いわゆる「6のルール（rule of six）」； Kolakofski, D. et al., J. Virol. 72:891-899, 1998; Calain, P. and Roux, L., J. Virol. 67:4822-4830, 1993; Calain, P. and Roux, L., J. Virol. 67: 4822-4830, 1993）。このプライマーにE-I-S配列を付加する場合には、挿入断片のオリゴDNAの3'側にセンダイウィルスのS配列の相補鎖配列、好ましくは5'-CTTTCACCCCT-3'（配列番号：1）、I配列の相補鎖配列、好ましくは5'-AAG-3'、E配列の相補鎖配列、好ましくは5'-TTTTTCTTACTACGG-3'（配列番号：2）、さらにその3'側に所望のcDNA配列の終始コドンから逆に数えて約25塩基相当の相補鎖の最後の塩基がGまたはCになるように長さを選択して配列を付加し、リバース側合成DNAの3'の末端とする。

PCRは、Taqポリメラーゼまたはその他のDNAポリメラーゼを用いる通常の方法を用いることができる。増幅した目的断片はNotIで消化した後、pBluescript等のプラスミドベクターのNotI部位に挿入する。得られたPCR産物の塩基配列をシークエンサーで確認し、正しい配列のプラスミドを選択する。このプラスミドから挿入断片をNotIで切り出し、ゲノムcDNAを含むプラスミドのNotI部位にクローニングする。またプラスミドベクターを介さずにNotI部位に直接挿入し、組み換えセンダイウィルスcDNAを得ることも可能である。

例えば、組み換えセンダイウィルスゲノムcDNAであれば、文献記載の方法に準じて構築することができる（Yu, D. et al., Genes Cells 2: 457-466, 1997; Hasan, M. K. et al., J. Gen. Virol. 78: 2813-2820, 1997）。例えば、NotI制限部位を有する18bpのスペーサー配列（5'-(G)-CGGCCGGCAGATCTTCACG-3'）（配列番号：3）を、クローニングされたセンダイウィルスゲノムcDNA（pSeV(+））のリーダー配列とN蛋白質のORFとの間に挿入し、デルタ肝炎ウィルスのアンチゲノム鎖（antigenomic strand）由来の自己開裂リボザイム部位を含むプラスミドpSeV18'b(+)を得る（Hasan, M. K. et al., 1997, J. General Virology 78:

2813-2820)。pSeV18'b(+)のNotI部位に外来遺伝子断片を挿入し、所望の外来遺伝子が組み込まれた組み換えセンダイウイルスcDNAを得ることができる。

このようにして作製した組み換えパラミクソウイルスのゲノムRNAをコードするDNAを、上記のウイルス蛋白質(L、P、およびN)存在下で細胞内で転写させることにより、本発明のベクターを再構成することができる。本発明は、本発明のベクターの製造のための、本発明のベクターのウイルスゲノムRNAをコードするDNAを提供する。また本発明は、本発明のベクターの製造に適用するための、該ベクターのゲノムRNAをコードするDNAの使用に関する。組み換えウイルスの再構成は公知の方法を利用して行うことができる(WO97/16539; WO97/16538; Durbin, A. P. et al., 1997, *Virology* 235: 323-332; Whelan, S. P. et al., 1995, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 8388-8392; Schnell, M. J. et al., 1994, *EMBO J.* 13: 4195-4203; Radecke, F. et al., 1995, *EMBO J.* 14: 5773-5784; Lawson, N. D. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 4477-4481; Garcin, D. et al., 1995, *EMBO J.* 14: 6087-6094; Kato, A. et al., 1996, *Genes Cells* 1: 569-579; Baron, M. D. and Barrett, T., 1997, *J. Virol.* 71: 1265-1271; Bridgen, A. and Elliott, R. M., 1996, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 15400-15404)。これらの方針により、パラインフルエンザ、水疱性口内炎ウイルス、狂犬病ウイルス、麻疹ウイルス、リンダーペストウイルス、センダイウイルスなどを含むマイナス鎖RNAウイルスをDNAから再構成させることができる。これらの方法に準じて、本発明のベクターを再構成させることができる。ウイルスベクターDNAにおいて、F遺伝子、HN遺伝子、および/またはM遺伝子を欠失させた場合には、そのままで感染性のウイルス粒子を形成しないが、宿主細胞に、これら欠失させた遺伝子および/または他のウイルスのエンベロープ蛋白質をコードする遺伝子などを別途、細胞に導入し発現させることにより、感染性のウイルス粒子を形成させることが可能である。

具体的な手順は、(a) パラミクソウイルスゲノムRNA(ネガティブ鎖RNA)ま

たはその相補鎖（ポジティブ鎖）をコードするcDNAを、N、P、およびL蛋白質を発現する細胞で転写させる工程、（b）該細胞またはその培養上清から該ゲノムRNAを含む複合体を回収する工程、により製造することができる。転写のために、ゲノムRNAをコードするDNAは適当なプロモーターの下流に連結される。転写されたゲノムRNAはN、L、およびP蛋白質の存在下で複製されRNP複合体を形成する。そしてM、HN、およびF蛋白質の存在下でエンベロープに包まれたウイルス粒子が形成される。ゲノムRNAをコードするDNAは、例えばT7プロモーターの下流に連結させ、T7 RNAポリメラーゼによりRNAに転写させる。プロモーターとしては、T7ポリメラーゼの認識配列を含むもの以外にも所望のプロモーターを利用することができる。あるいは、インビトロで転写させたRNAを細胞にトランスフェクトしてもよい。

DNAからのゲノムRNAの最初の転写に必要なT7 RNAポリメラーゼ等の酵素は、これを発現するプラスミドベクターまたはウイルスベクターの導入によって供給することができるし、または、例えば細胞の染色体にこの遺伝子を、発現を誘導できるように組み込んでおき、ウイルス再構成時に発現を誘導することにより供給することもできる。またゲノムRNA、およびベクター再構成に必要なウイルス蛋白質は、例えばこれらを発現するプラスミドの導入によって供給する。これらのウイルス蛋白質の供給において、野生型またはある種の変異パラミクソウイルスなどのヘルパーウィルスを用いることもできるが、これらのウイルスの混入を招くため好ましくない。

ゲノムRNAを発現するDNAを細胞内に導入する方法には、例えば次のような方法、①目的の細胞が取り込めるようなDNA沈殿物を作る方法、②目的の細胞による取りこみに適し、かつ細胞毒性の少ない陽電荷特性を持つDNAを含む複合体を作る方法、③目的の細胞膜に、DNA分子が通り抜けられるだけに十分な穴を電気パルスによって瞬間的に開ける方法などがある。

②としては、種々のトランスフェクション試薬が利用できる。例えば、DOTMA（

Roche)、Superfect (QIAGEN #301305)、DOTAP、DOPE、DOSPER (Roche #1811169) などが挙げられる。①としては例えばリン酸カルシウムを用いたトランスフェクション法が挙げられ、この方法によって細胞内に入ったDNAは貧食小胞に取り込まれるが、核内にも十分な量のDNAが入ることが知られている (Graham, F. L. and Van Der Eb, J., 1973, *Virology* 52: 456; Wigler, M. and Silverstein, S., 1977, *Cell* 11: 223)。ChenおよびOkayamaはトランスファー技術の最適化を検討し、1) 細胞と共に沈殿物のインキュベーション条件を 2~4% CO<sub>2</sub>、35°C、15~24時間、2) DNAは直鎖状より環状のものが活性が高く、3) 沈殿混液中のDNA濃度が 20~30 μg/ml のとき最適な沈殿が得られると報告している (Chen, C. and Okayama, H., 1987, *Mol. Cell. Biol.* 7: 2745)。②の方法は、一過的なトランスフェクションに適している。古くはDEAE-デキストラン (Sigma #D-9885 M. W. 5×10<sup>5</sup>) 混液を所望のDNA濃度比で調製し、トランスフェクションを行う方法が知られている。複合体の多くはエンドソームの中で分解されてしまうため、効果を高めるためにクロロキンを加えることもできる (Calos, M. P., 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 3015)。③の方法は電気穿孔法と呼ばれる方法で、細胞選択性がないという点で①および②の方法に比べて汎用性が高い。効率はパルス電流の持続時間、パルスの形、電界 (電極間のギャップ、電圧) の強さ、バッファーの導電率、DNA濃度、細胞密度の最適条件下で良いとされている。

以上、3つのカテゴリーの中で②の方法は操作が簡便で多量の細胞を用いて多数の検体を検討することができるので、ベクター再構成のためのDNAの細胞への導入には、トランスフェクション試薬が適している。好適には Superfect Transfection Reagent (QIAGEN, Cat No. 301305)、または DOSPER Liposomal Transfection Reagent (Roche, Cat No. 1811169) が用いられるが、これらに制限されない。

cDNAからのウイルスの再構成は具体的には例えば以下のようにして行うことができる。

24穴から6穴程度のプラスチックプレートまたは100mmペトリ皿等で、10%ウシ胎児血清(FCS)および抗生物質(100 units/ml ペニシリンGおよび100  $\mu$ g/ml ストレプトマイシン)を含む最少必須培地(MEM)を用いてサル腎臓由来細胞株LLC-MK2をほぼ100%コンフルエントになるまで培養し、例えば1  $\mu$ g/ml psoralen(ソラレン)存在下UV照射処理を20分処理で不活化した、T7 RNAポリメラーゼを発現する組換えワクシニアウィルスvTF7-3(Fuerst, T. R. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 8122-8126, 1986、Kato, A. et al., Genes Cells 1: 569-579, 1996)を2 PFU/細胞で感染させる。ソラレンの添加量およびUV照射時間は適宜調整することができる。感染1時間後、2~60  $\mu$ g、より好ましくは3~20  $\mu$ gの組換えセンダイウィルスのゲノムRNAをコードするDNAを、ウィルスRNPの生成に必須なトランスに作用するウィルス蛋白質を発現するプラスミド(0.5~24  $\mu$ gのpGEM-N、0.25~12  $\mu$ gのpGEM-P、および0.5~24  $\mu$ gのpGEM-L)(Kato, A. et al., Genes Cells 1: 569-579, 1996)と共にSuperfect(QIAGEN社)を用いたリポフェクション法等によりトランスフェクションする。N、P、およびLをコードする発現ベクターの量比は2:1:2とすることが好ましく、プラスミド量は、例えば1~4  $\mu$ gのpGEM-N、0.5~2  $\mu$ gのpGEM-P、および1~4  $\mu$ gのpGEM-L程度で適宜調整する。

トランスフェクションを行った細胞は、所望により100  $\mu$ g/mlのリファンピシン(Sigma)及びシトシンアラビノシド(AraC)、より好ましくは40  $\mu$ g/mlのシトシンアラビノシド(AraC)(Sigma)のみを含む血清不含のMEMで培養し、ワクシニアウィルスによる細胞毒性を最少にとどめ、ウィルスの回収率を最大にするよう薬剤の最適濃度を設定する(Kato, A. et al., 1996, Genes Cells 1: 569-579)。トランスフェクションから48~72時間程度培養後、細胞を回収し、凍結融解を3回繰り返して細胞を破碎した後、RNPを含む破碎物をLLC-MK2細胞に再度トランスフェクションして培養する。または、培養上清を回収し、LLC-MK2細胞の培養液に添加して感染させ培養する。トランスフェクションは、例えばリポフェクトアミンまたはポリカチオニックリポソームなどと共に複合体を形成させて細胞に

導入することが可能である。具体的には、種々のトランスフェクション試薬が利用できる。例えば、DOTMA (Roche)、Superfect (QIAGEN #301305)、DOTAP、DOPE、DOSPER (Roche #1811169) などが挙げられる。エンドソーム中での分解を防ぐため、クロロキンを加えることもできる (Calos, M. P., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 3015)。RNPが導入された細胞では、RNPからのウイルス遺伝子の発現およびRNPの複製の過程が進行しベクターが増幅する。得られたウイルス溶液を希釈 (例えば $10^6$  倍) して再増幅を繰り返すことにより、ワクシニアウイルスvTF7-3は完全に除去することができる。再増幅は、例えば3回以上繰り返す。得られたベクターは-80°Cで保存することができる。エンベロープ蛋白質をコードする遺伝子を欠損した伝播能を持たないウイルスベクターを再構成させるには、エンベロープ蛋白質を発現するLLC-MK2細胞をトランスフェクションに使用するか、またはエンベロープ発現プラスミドと共にトランスフェクションすればよい。また、トランスフェクションを行った細胞にエンベロープ蛋白質を発現するLLC-MK2細胞を重層して培養することによって欠損型ウイルスベクターを増幅することもできる (国際公開番号 W000/70055 および W000/70070参照)。

回収されたウイルスの力価は、例えばCIU (Cell-Infected Unit) 測定または赤血球凝集活性 (HA) の測定することにより決定することができる (W000/70070; Kato, A. et al., 1996, Genes Cells 1: 569-579; Yonemitsu, Y. & Kaneda, Y., Hemaggulutinating virus of Japan-liposome-mediated gene delivery to vascular cells. Ed. by Baker AH. Molecular Biology of Vascular Diseases. Method in Molecular Medicine: Humana Press: pp. 295-306, 1999)。また、GFP (緑色蛍光蛋白質) などのマーカー遺伝子を搭載したベクターについては、マーカーを指標に直接的に感染細胞をカウントすることにより力価を定量することができる (例えばGFP-CIUとして)。このようにして測定した力価は、CIUと同等に扱うことができる (W000/70070)。

ウイルスベクターが再構成する限り、再構成に用いる宿主細胞は特に制限され

ない。例えば、センダイウイルスベクター等の再構成においては、サル腎由来のLLCMK2細胞およびCV-1細胞、ハムスター腎由来のBHK細胞などの培養細胞、ヒト由来細胞等を使うことができる。これらの細胞に適当なエンベロープ蛋白質を発現させることで、その蛋白質をエンベロープに含む感染性ウイルス粒子を得ることもできる。また、大量にセンダイウイルスベクターを得るために、上記の宿主から得られたウイルスベクターを発育鶏卵に感染させ、該ベクターを増幅することができる。鶏卵を使ったウイルスベクターの製造方法は既に開発されている（中西ら編, (1993), 「神経科学研究の先端技術プロトコールIII, 分子神経細胞生理学」, 厚生社, 大阪, pp. 153-172）。具体的には、例えば、受精卵を培養器に入れ9～12日間 37～38°Cで培養し、胚を成長させる。ウイルスベクターを尿膜腔へ接種し、数日間（例えば3日間）卵を培養してウイルスベクターを増殖させる。培養期間等の条件は、使用する組み換えセンダイウイルスにより変わり得る。その後、ウイルスを含んだ尿液を回収する。尿液からのセンダイウイルスベクターの分離・精製は常法に従って行うことができる（田代眞人, 「ウイルス実験プロトコール」, 永井、石浜監修, メジカルビュー社, pp. 68-73, (1995)）。

例えば、F遺伝子を欠失したセンダイウイルスベクターの構築と調製は、以下のように行うことができる（国際公開番号 WO00/70055 および WO00/70070 参照）。

〈1〉 F遺伝子欠失型センダイウイルスゲノムcDNAおよびF発現プラスミドの構築

センダイウイルス (SeV) 全長ゲノムcDNA、pSeV18<sup>+</sup> b(+) (Hasan, M. K. et al., 1997, J. General Virology 78: 2813-2820)（「pSeV18<sup>+</sup> b(+)」は「pSeV18<sup>+</sup>」ともいう）のcDNAをSphI/KpnIで消化してフラグメント(14673bp)を回収し、pUC18にクローニングしてプラスミドpUC18/KSとする。F遺伝子欠損部位の構築はこのpUC18/KS上で行う。F遺伝子の欠損は、PCR-ライゲーション方法の組み合わせで行い、結果としてF遺伝子のORF (ATG-TGA=1698bp) を除いて例えばatgcatgcgcggcagatga（配列番号：4）で連結し、F遺伝子欠失型SeVゲノムcDNA (pSeV18<sup>+</sup>/ΔF) を構築する。PCRは、Fの上流には [forward: 5'-gtttagtactgcaagagc/配列番号

: 5, reverse: 5'-tttgcggcatgcattttcccaagggagatttgcaacc／配列番号：6]、F遺伝子の下流には [forward: 5'-atgcatgcggcagatga／配列番号：7, reverse: 5'-tgggtgaatgagagaatcagc／配列番号：8] のプライマー対を用いたPCRの産物をEcoT22Iで連結する。このように得られたプラスミドをSacIとSalIで消化して、F遺伝子欠損部位を含む領域の断片 (4931bp) を回収してpUC18にクローニングし、pUC18/dFSSとする。このpUC18/dFSSをDraIIIで消化して、断片を回収してpSeV18<sup>+</sup>のF遺伝子を含む領域のDraIII断片と置き換え、ライゲーションしてプラスミドpSeV18<sup>+</sup>/ΔFを得る。

外来遺伝子は、例えばpUC18/dFSSのF遺伝子欠失部位にある制限酵素 NsiI および NgoMIV 部位に挿入する。このためには、例えば外来遺伝子断片を、NsiI-tailedプライマーおよびNgoMIV-tailedプライマーで増幅すればよい。

#### <2> SeV-F蛋白を誘導発現するヘルパー細胞の作製

センダイウイルスのF遺伝子 (SeV-F) を発現するCre/loxP誘導型発現プラスミドの構築はSeV-F遺伝子をPCRで増幅し、Cre DNAリコンビナーゼにより遺伝子産物を誘導発現されるように設計されたプラスミドpCALNdLw (Arai, T. et al., J. Virology 72, 1998, p1115-1121) のユニークサイト SwaI部位に挿入し、プラスミドpCALNdLw/Fを構築する。

F遺伝子欠損ゲノムから感染ウイルス粒子を回収するため、SeV-F蛋白を発現するヘルパー細胞株を樹立する。細胞は、例えばSeVの増殖によく用いられているサル腎臓由来細胞株LLC-MK2細胞を用いることができる。LLC-MK2細胞は、10%の熱処理した不動化ウシ胎児血清(FBS)、ペニシリンGナトリウム 50単位/ml、およびストレプトマイシン 50 μg/mlを添加したMEMで37°C、5% CO<sub>2</sub>で培養する。SeV-F遺伝子産物は細胞傷害性を有するため、Cre DNAリコンビナーゼによりF遺伝子産物を誘導発現されるように設計された上記プラスミドpCALNdLw/Fを、リン酸カルシウム法 (mammalian transfection kit (Stratagene)) により、周知のプロトコールに従ってLLC-MK2細胞に遺伝子導入を行う。

10cmプレートを用い、40%コンフルエントまで生育したLLC-MK2細胞に10 $\mu$ gのプラスミドpCALNdLw/Fを導入後、10mlの10%FBSを含むMEM培地にて、37°Cの5%CO<sub>2</sub>インキュベーター中で24時間培養する。24時間後に細胞をはがし、10ml培地に懸濁後、10cmシャーレ5枚を用い、5ml 1枚、2ml 2枚、0.2ml 2枚に蒔き、G418 (GIBCO-BRL)を1200 $\mu$ g/mlを含む10mlの10%FBSを含むMEM培地にて培養を行い、2日毎に培地交換しながら、14日間培養し、遺伝子の安定導入株の選択を行う。該培地により生育してきたG418に耐性を示す細胞はクローニングリングを用いて回収する。回収した各クローンは10cmプレートでコンフルエントになるまで拡大培養を続ける。

F蛋白質の発現誘導は、細胞を6cmシャーレにてコンフルエントまで生育させた後、アデノウイルスAxCANCreを斎藤らの方法 (Saito et al., Nucl. Acids Res. 23: 3816-3821 (1995); Arai, T. et al., J. Virol. 72, 1115-1121 (1998)) により例えれば moi=3 で感染させて行う。

### <3> F遺伝子欠失SeVウイルスの再構築及び増幅

上記 pSeV18<sup>+</sup>/ΔF の外来遺伝子が挿入されたプラスミドを以下のようにして LLC-MK2細胞にトランスフェクションする。LLC-MK2 細胞を $5 \times 10^6$  cells/dish で 100mmのシャーレに播く。T7 RNAポリメラーゼによりゲノムRNAの転写を行わせる場合には、細胞培養24時間後、ソラレン (psoralen) と長波長紫外線 (365nm) で 20 分間処理したT7 RNAポリメラーゼを発現するリコンビナントワクシニアウイルス (PLWUV-VacT7 : Fuerst, T. R. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 8122-8126 (1986)) をMOI 2程度で室温で1時間感染させる。ワクシニアウイルスへの紫外線照射には、例えは15ワットバルブを5本が装備された UV Stratalinker 2400 (カタログ番号 400676 (100V), ストラタジーン社, La Jolla, CA, USA) を用いることができる。細胞を無血清のMEMで洗浄した後、ゲノムRNAを発現するプラスミド、およびパラミクソウイルスのそれぞれN、P、L、F、およびHN蛋白質を発現する発現プラスミド適当なリポフェクション試薬と用いてこの細胞にトラン

スフェクトする。プラスミドの量比は、これに限定されないが、好適には順に 6 : 2 : 1 : 2 : 2 : 2 とすることができます。例えば、12 μgのゲノムRNAを発現するプラスミド、並びにN、P、L、およびFプラスHN蛋白質を発現する発現プラスミド（pGEM/NP, pGEM/P, pGEM/L及びpGEM/F-HN; WO00/70070, Kato, A. et al., Genes Cells 1, 569-579 (1996)）を、それぞれ12 μg, 4 μg, 2 μg, 4 μg及び4 μg/dishの量比トランスフェクトする。数時間培養後、血清を含まないMEMで細胞を2回洗浄し、40 μg/mLの Cytosine β-D-arabinofuranoside (AraC : Sigma, St. Louis, MO) 及び7.5 μg/mLのTrypsin (Gibco-BRL, Rockville, MD) を含むMEMで培養する。これらの細胞を回収し、ペレットをOptiMEMに懸濁する (10<sup>7</sup> cells/ml)。凍結融解を3回繰り返してlipofection reagent DOPHER (Boehringer mannheim)と混合し (10<sup>6</sup>cells/25 μl DOPHER) 室温で15分放置した後、上記でクローニングしたF発現ヘルパー細胞にトランスフェクション (10<sup>6</sup>cells/well 12-well-plate) し、血清を含まないMEM (40 μg/ml AraC, 7.5 μg/ml トリプシンを含む)で培養し、上清を回収する。F以外の遺伝子、例えばHNまたはM遺伝子を欠損したウイルスも、これと同様の方法で調製することができる。

ウイルス遺伝子欠損型ベクターを調製する場合、例えば、ベクターに含まれるウイルスゲノム上で欠損しているウイルス遺伝子が異なる2種またはそれ以上のベクターを同じ細胞に導入すれば、それぞれで欠損するウイルス蛋白質が、他のベクターからの発現により供給されるため、互いに相補しあって感染力のあるウイルス粒子が形成され、複製サイクルがまわりウイルスベクターが増幅される。すなわち、2種またはそれ以上の本発明のベクターを、ウイルス蛋白質を相補する組み合わせで接種すれば、それぞれのウイルス遺伝子欠損型ウイルスベクターの混合物を大量かつ低コストで生産することができる。これらのウイルスは、ウイルス遺伝子が欠損しているため、ウイルス遺伝子を欠損していないウイルスに比べゲノムサイズが小さくなりサイズの大きい外来遺伝子を保持することができ

る。また、ウィルス遺伝子の欠損により増殖性がないこれらのウィルスは細胞外で希釈され共感染の維持が困難であることから、不活性化するため、環境放出管理上の利点がある。例えば抗体H鎖をコードするベクターとL鎖コードするベクターとを互いに相補できるように別々に構築し、これらの共感染させることも考えられる。本発明は、抗体のH鎖可変領域を含むポリペプチドをコードするパラミクソウイルスベクター、および抗体のL鎖可変領域を含むポリペプチドをコードするパラミクソウイルスベクターを含む組成物を提供する。また本発明は、抗体のH鎖可変領域を含むポリペプチドをコードするパラミクソウイルスベクター、および抗体のL鎖可変領域を含むポリペプチドをコードするパラミクソウイルスベクターを含むキットを提供する。これらの組成物およびキットは、同時に感染させることでH鎖およびL鎖からなる抗体を形成させるために使用できる。

なお、伝播性のパラミクソウイルスベクターを個体または細胞に投与後、治療が完了するなどウイルスベクターの増殖を抑止する必要が生じた際には、RNA依存性RNAポリメラーゼ阻害剤を投与すれば、宿主に障害を与えずにウイルスベクターの増殖だけを特異的に抑止することもできる。

本発明の方法によれば、本発明のウイルスベクターは、例えば  $1 \times 10^5$  CIU/mL以上、好ましくは  $1 \times 10^6$  CIU/mL以上、より好ましくは  $5 \times 10^6$  CIU/mL以上、より好ましくは  $1 \times 10^7$  CIU/mL以上、より好ましくは  $5 \times 10^7$  CIU/mL以上、より好ましくは  $1 \times 10^8$  CIU/mL以上、より好ましくは  $5 \times 10^8$  CIU/mL以上の力価でウイルス産生細胞の細胞外液中に放出させることが可能である。ウイルスの力価は、本明細書および他に記載の方法により測定することができる (Kiyotani, K. et al., *Virology* 177(1), 65-74 (1990); WO00/70070)。

回収したパラミクソウイルスベクターは実質的に純粋になるよう精製することができる。精製方法はフィルトレーション(濾過)、遠心分離、およびカラム精製等を含む公知の精製・分離方法またはその組み合わせにより行うことができる。「実質的に純粋」とは、ウイルスベクターが、それが存在する試料中の成分と

して主要な割合を占めることを言う。典型的には、実質的に純粋なウイルスベクターは、試料中に含まれる全蛋白質（但しキャリアーや安定剤として加えた蛋白質は除く）のうち、ウイルスベクター由来の蛋白質の割合が10%以上、好ましくは20%以上、より好ましくは50%以上、好ましくは70%以上、より好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上を占めることにより確認することができる。パラミクソウイルスの具体的な精製方法としては、例えばセルロース硫酸エステルまたは架橋ポリサッカライド硫酸エステルを用いる方法（特公昭62-30752号公報、特公昭62-33879号公報、および特公昭62-30753号公報）、およびフコース硫酸含有多糖および/またはその分解物に吸着させる方法（WO97/32010）等を例示することができる。

ベクターを含む組成物の製造においては、ベクターは必要に応じて薬理学的に許容される所望の担体または媒体と組み合わせることができる。「薬学的に許容される担体または媒体」とは、ベクターと共に投与することが可能であり、ベクターによる遺伝子導入を有意に阻害しない材料である。例えばベクターを生理食塩水またはリン酸緩衝生理食塩水（PBS）などで適宜希釈して組成物とすることができる。ベクターを鶏卵で増殖させた場合等においては尿液を含んでよい。またベクターを含む組成物は、脱イオン水、5%デキストロース水溶液等の担体または媒体を含んでいてもよい。さらに、その他にも、植物油、懸濁剤、界面活性剤、安定剤、殺生物剤等が含有されていてもよい。また保存剤またはその他の添加剤を添加することができる。本発明のベクターを含む組成物は試薬として、および医薬として有用である。

ベクターの投与量は、疾患、患者の体重、年齢、性別、症状、投与目的、投与組成物の形態、投与方法、導入遺伝子等により異なるが、当業者であれば適宜決定することができる。投与経路は適宜選択することができるが、例えば経皮的、鼻腔内的、経気管支的、筋内的、腹腔内、静脈内、関節内、脊髄腔内、または皮下等に行われうるがそれらに限定されない。また局所あるいは全身に投与し

得る。投与されるベクター量は好ましくは約 $10^5$  CIU/mlから約 $10^{11}$  CIU/ml、より好ましくは約 $10^7$  CIU/mlから約 $10^9$  CIU/ml、最も好ましくは約 $1 \times 10^8$  CIU/mlから約 $5 \times 10^8$  CIU/mlの範囲内の量を薬学上容認可能な担体中で投与することが好ましい。ヒトにおいては1回当たりの投与量は $2 \times 10^5$  CIU～ $2 \times 10^{10}$  CIUが好ましく、投与回数は、1回または臨床上容認可能な副作用の範囲で複数回可能であり、1日の投与回数についても同様である。本発明のベクターを用いて製造された蛋白質製剤であれば、蛋白質の投与量は例えば、10ng/kgから $100 \mu\text{g}/\text{kg}$ 、好ましくは100ng/kgから $50 \mu\text{g}/\text{kg}$ 、より好ましくは $1 \mu\text{g}/\text{kg}$ から $5 \mu\text{g}/\text{kg}$ の範囲であるとよい。ヒト以外の動物についても、例えば目的の動物とヒトとの体重比または投与標的部位の容積比（例えば平均値）で上記の投与量を換算した量を投与することができる。本発明のベクターを含む組成物の投与対象としては、ヒト、サル、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ウシ、イヌなど全ての哺乳動物が含まれる。

#### 図面の簡単な説明

図1は、NOGOの中和抗体のFab (H鎖及びL鎖) をコードするNotI断片の塩基配列を示す図である。蛋白質コード配列は大文字で示した。また、SeVのEシグナル、介在配列、Sシグナルの塩基配列を、実線下線-点線下線-実線下線で示した。波線はNotIと同じ接着末端となる部位を示し、この配列を利用して、H鎖およびL鎖のコード配列を例えば別々のベクターのNotI部位にクローニングすることもできる。

図2は、図1に示したFabをコードする断片の構築に使用したオリゴヌクレオチドを示す図である。SYN80 F1～SYN80 R16までを順に配列番号：12～42とした。

図3は、図2に示したオリゴヌクレオチドの配置を示す図である。

図4は、NOGOの中和抗体のFab遺伝子を搭載した伝播型ウィルス (SeV18+IN-1) (パネルA) および伝播能欠損型ウィルス (SeV18+IN-1/ΔF) (パネルB) の構造およびRT-PCRによるウィルスゲノムの確認を示す写真および図である。

図5は、NOGOの中和抗体のFab遺伝子を搭載した伝播型またはF遺伝子欠失型ウイルスからのFabの発現を示す写真である。ネガティブコントロール (NC) として GFP遺伝子を搭載した伝播型SeVベクターを用いた。感染の2日後 (d2) または4日後 (d4) の抗体の発現を示す。

図6は、NIH-3T3細胞の形態に影響するq-poolの活性に対するIN-1遺伝子搭載SeVの作用を示す写真である。各条件での培養開始3日後 (SeV感染2日後) のNIH-3T3細胞の顕微鏡写真を示した。(A)：q-pool未処理プレートを使用、(B)：q-pool処理プレートを使用、(C)：q-pool処理プレートを使用しSeV18+GFPをMOI=1で感染、(D)：(C) と同一視野でGFP蛍光写真を撮影・重ね合わせ (SeV感染細胞の割合の指標) 、(E)：q-pool処理プレートを使用しSeV18+IN1をMOI=1で感染。

図7は、NIH-3T3細胞の細胞増殖に対するIN-1遺伝子搭載SeVの作用を示す図である。各条件での培養開始3日後 (SeV感染2日後) のNIH-3T3細胞の細胞数比率を Alamar blueを用いたミトコンドリア活性を元に測定した。(A)：q-pool未処理プレートを使用、(B)：q-pool処理 ( $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) プレートを使用、(C)：q-pool処理 ( $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) プレートを使用、(D)：q-pool処理 ( $30 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) プレートを使用しSeV18+IN1をMOI=1で感染。

図8は、ラット後根神経節神経細胞の突起伸展に影響するq-poolの活性に対するIN-1遺伝子搭載SeVの作用を示す写真である。各条件でのSeV感染36時間後 (培養開始60時間後) のラット後根神経節神経細胞の顕微鏡写真を示した。(A) q-pool未処理プレートを使用しSeV18+GFPを $1 \times 10^5 \text{ CIU}/500 \mu\text{L}/\text{well}$ で感染した細胞。(C) q-pool処理プレートを使用しSeV18+GFPを $1 \times 10^5 \text{ CIU}/500 \mu\text{L}/\text{well}$ で感染した細胞。(B) 及び (D) はそれぞれ (A) 及び (C) と同視野のGFP蛍光写真。(E) 及び (F) q-pool処理プレートを使用しSeV18+IN1を $1 \times 10^5 \text{ CIU}/500 \mu\text{L}/\text{well}$ で感染した細胞。

図9は、GFP遺伝子搭載SeVベクターマウス耳介投与後のGFP由来蛍光の経時変化を示す写真である。GFP遺伝子を有する伝播型SeVベクター (SeV18+GFP :  $5 \times 10^6$

GFP-CIU/5 μL) 或いはF遺伝子欠失型SeVベクター (SeV18+GFP/ΔF : 5x10<sup>6</sup> GFP- CIU/5 μL) をマウス耳介に投与し、GFP蛋白の蛍光を外部から経時的に観察した。

図10は、耳介投与法の定量性評価(1)を示す図である。Luciferase遺伝子搭載SeVベクターでの評価：(A)投与タイマー依存性。Luciferase遺伝子を搭載している伝播型SeVベクター(SeV18+Luci)の投与タイマーを変えてマウス耳介に投与し(5x10<sup>4</sup>, 5x10<sup>5</sup>, 5x10<sup>6</sup> CIU/5 μL)、投与2日後に耳介を切除後、組織をホモジナイズし、Luciferase活性を調べた(n=3)。投与タイマー依存的なLuciferase活性の変化が見られた。(B)経時変化。SeV18+Luci(5x10<sup>6</sup> CIU/5 μL)をマウス耳介に投与し、経時的にそれぞれの耳介を切除後、組織をホモジナイズし、Luciferase活性を調べた(n=3)。

図11は、耳介投与法の定量性評価(2)を示す写真および図である。GFP遺伝子搭載SeVベクターでの評価：SeV18+GFP(5x10<sup>6</sup> GFP- CIU/5 μL)をマウス耳介に投与し、GFP蛋白の蛍光を外部から経時的に観察した(n=4)。(A) GFP蛍光写真。(B) GFP蛍光強度の定量化。画像処理ソフトAdobe Photoshopにて緑色蛍光を抽出した後、画像解析ソフトNIH imageにて蛍光強度の定量を行った。

図12は、繰り返し投与での評価法という観点からの耳介投与法の有用性を示す写真および図である。マウス右耳の耳介にSeV18+GFP/ΔF(5x10<sup>6</sup> GFP- CIU/5 μL)を投与し(一回目投与)、次に投与1, 2, 4, 6, 8, 28, 62日後に、左耳耳介へSeV18+GFP/ΔF(5x10<sup>6</sup> GFP- CIU/5 μL)を投与した(二回目投与)。それぞれの投与後、経時的にGFP蛍光の強度変化を調べた。(A) GFP蛍光写真。(B) GFP蛍光強度の定量化。

図13は、耳介投与法による感染細胞の同定(1)を示す写真である。マウス耳介にSeV18+GFP/ΔF(5x10<sup>6</sup> GFP- CIU/5 μL)を投与し、感染2日後に耳介を切除し、凍結切片を作成、蛍光顕微鏡下GFP蛍光を観察した(A)。同連続切片を抗GFP抗体で染色した(C)。(B)はこれらの重ね合わせを示す。

図14は、耳介投与法による感染細胞の同定(2)を示す写真である。マウス耳

介にSeV18+GFP/ΔF<sub>1</sub> (5x10<sup>6</sup> GFP-CIU/5 μL) を投与し、感染2日後に耳介を切除し、凍結切片を作成、蛍光顕微鏡下GFP蛍光を観察した（図13とは別の個体）。

図15は、抗CD28抗体遺伝子断片 (SYN205-13) の合成に使用したoligo DNAの配置を示す図である。

図16は、抗CD28抗体遺伝子を搭載するSeVベクターcDNA構築の概略を示す図である。

図17は、抗CD28抗体遺伝子を搭載するSeVベクター (SeV18+αCD28cst/ΔF-GFP) のRT-PCRによるウイルスゲノムの確認を示す写真である。

図18は、αCD28遺伝子を搭載するSeVベクター (SeV18+αCD28cst/ΔF-GFP) からの抗体の発現を示す写真である。

図19は、抗CD28抗体 (αCD28cst) GFP遺伝子搭載SeVベクター (SeV18+αCD28cst/ΔF-GFP) のマウス耳介投与後のGFP由来蛍光の経時変化を示す写真である。5x10<sup>6</sup> GFP-CIU/5 μLをマウス耳介に投与し、GFP蛋白の蛍光を外部から経時的に観察した。SeV18+GFP/ΔF投与群との比較を行った。

図20は、感染初期のCTLA4-Ig蛋白投与を併用した場合のSeV18+αCD28cst/ΔF-GFPのマウス耳介投与後のGFP由来蛍光の経時変化を示す写真である。5x10<sup>6</sup> GFP-CIU/5 μLをマウス耳介に投与し、投与1時間後及び10時間後にCTLA4-Ig蛋白を0.5 mg/bodyで腹腔内に投与し、GFP蛋白の蛍光を外部から経時的に観察した。同じ処理をしたSeV18+GFP/ΔF投与群との比較を行った。

図21は、GFP蛍光強度の定量化を示す図である。図19及び図20の蛍光写真を基に、画像処理ソフトAdobe Photoshopにて緑色蛍光を抽出した後、画像解析ソフトNIH imageにて蛍光強度の定量を行った。

図22は、GFP遺伝子の搭載位置の違いによるGFP由来蛍光強度の違いを示す写真である (in vitroでの確認)。SeV18+GFP/ΔF或いはSeV18+αCD28cst/ΔF-GFPをLLC-MK2細胞にMOI=3で感染し、経時的にGFP蛍光を観察した。

### 発明を実施するための最良の形態

以下、実施例により本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれら実施例に制限されるものではない。なお、本明細書中に引用された文献は、本明細書の一部として組み込まれる。

#### [実施例 1] Fab遺伝子を搭載したSeVベクターの構築

SeVベクターの脊髄損傷への応用の一つとして、軸索伸長阻害因子 (NOGO等) の阻害を目的とする治療ベクターを例示する。NOGOの中和抗体として、IN-1 (mouse IgM  $\kappa$ 型) が知られていることから (Brosamle, C. et al., J. Neurosci. 20(21), 8061-8068 (2000) 等)、このIN-1を搭載した伝播型SeVベクターの構築を行った。また、F遺伝子欠失型SeVベクター (伝播能欠損型) についても構築を行った。

##### 1) 遺伝子の全合成

IN-1のFab (H鎖及びL鎖) 遺伝子を搭載したSeVベクターを構築するため、IN-1のFab遺伝子の全合成を実施した。IN-1の single chain Fab 部分の塩基配列 (Accession No. Y08011; Bandtlow, C. et al., Eur. J. Biochem. 241(2) 468-475 (1996)) を元に、His-tagは除き、両端に NotI 認識配列を含み、H鎖 (配列番号: 1-0) 及びL鎖 (配列番号: 1-1) がSeVのEIS配列を挟んでtandemに結合するよう配列をデザインした (図1 ; 配列番号: 9)。合成に使用したoligo DNAの配列および名称を図2に示し、その配置を図3に示した。NotI断片の全長は6n (6の倍数) となるようにした。

##### 2) IN-1(Fab) 搭載SeV cDNAの遺伝子構築

上記で合成したNotI断片をpBluescript II KS (Stratagene, LaJolla, CA) へ挿入した。遺伝子配列を確認した後、このプラスミドから、EISを有するNotI断片をNotI切断により切り出し、伝播型 (pSeV18+) (Hasan, M. K. et al., J. Gen. Virol. 78: 2813-2820, 1997, Kato, A. et al., 1997, EMBO J. 16: 578-587 及び Yu, D. et al., 1997, Genes Cells 2: 457-466) 及びF遺伝子欠失型 (

pSeV18+/ΔF) (Li, H.-O. et al., J. Virol. 74(14) 6564-6569 (2000)) のセンダイウイルスゲノムをコードするプラスミドの+18位 (NotI部位) へ挿入し、それぞれ pSeV18+IN-1 および SeV18+IN-1/ΔF とした。

### 3) SeV再構成 (伝播型: SeV18+IN-1)

ウィルスの再構成はKatoらの報告 (Kato, A. et al., Genes Cells 1, 569-579 (1996)) に従って行った。LLC-MK2細胞を  $5 \times 10^6$  cells/dishで直径100mmのシャーレに播き、24時間培養後、ソラレン (psoralen) と長波長紫外線 (365nm) で20分間処理したT7ポリメラーゼを発現するリコンビナントワクシニアウィルス (PLWUV-VacT7 : Fuerst, T.R. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 8122-8126 (1986)) を37°Cで1時間感染させた (MOI=2)。細胞を血清を含まないMEMで洗浄した後、プラスミド pSeV18+IN-1, pGEM/NP, pGEM/P及びpGEM/L (Kato, A. et al., Genes Cells 1, 569-579 (1996)) をそれぞれ12μg, 4μg, 2μg及び4μg/dishの量比でOpti-MEM 200μL (Gibco-BRL, Rockville, MD) に懸濁し、1μg DNA/5μL相当のSuperFect transfection reagent (Qiagen, Bothell, WA)を入れて混合し、室温で15分間放置後、最終的に3% FBSを含むOpti-MEM 3mLに入れ、細胞に添加して培養した。5時間培養後血清を含まないMEMで2回洗浄し、40μg/mLの Cytosine β-D-arabinofuranoside (AraC : Sigma, St. Louis, MO) 及び7.5μg/mLのTrypsin (Gibco-BRL, Rockville, MD) を含むMEMで3日間培養した (P0)。

これらの細胞を回収し、ペレットを1mL/dishあたりの PBSに懸濁した。凍結融解を3回繰り返した後、胎生10日齢の有性卵に、前記ライゼートを100μL/eggあたり接種した。その後、転卵しながら35.5°Cで3日間培養した (P1)。4°Cに4~6時間放置後、漿尿液を回収し、赤血球凝集活性 (HA活性) 測定を行い、ウイルス回収の有無を検定した。

HA活性はKatoらの方法 (Kato, A. et al., Genes Cell 1, 569-579 (1996)) に倣って行った。即ち、丸底の96穴プレートを使用し、ウイルス液を段階的にPBSで

希釈し各well 50  $\mu$ Lの2倍希釈系列を作製した。その50  $\mu$ Lに1%濃度にPBSで希釈したニワトリ保存血（コスモバイオ, Tokyo, Japan）50  $\mu$ Lを混合し、4°Cで30分間放置し赤血球の凝集を観察し、凝集したもののうち最もウィルス希釈率の高いものの希釈率をHA活性として判定した。また、1 HAUを $1 \times 10^6$  ウィルスと換算して、ウィルス数として算出することができる。

回収したP1の漿尿液を、（HAUが観測された場合には）PBSにて $10^{-5}$ 及び $10^{-6}$ 希釈し、（HAUが観測されなかった場合には）希釈率を下げる、胎生10日齢のニワトリ有性卵に、前記希釈液を100  $\mu$ L/eggあたり接種し、その後、転卵しながら35.5°Cで3日間培養した（P2）。漿尿液を回収後、HA活性を測定してウイルス回収の有無を検定した。回収したP2の漿尿液を $10^{-5}$ 及び $10^{-6}$ 希釈後、同様の操作を行い（P3）、P3の漿尿液を回収し、HA活性を測定した。HA活性の上昇が観察され、ウィルスの再構成に成功したと判断された。回収した漿尿液のHA活性値（HAU）を下記に示した。タイマーは、P4の試料で $2^9$  HAU（約 $5 \times 10^8$  CIU/mL）と計算された。

表1

試料	P1	P2	P3	P4	
SeV18+IN-1	$2^2$	$2^{10}$	$2^8$	$2^9$	(HAU)

#### 4) SeV再構成（F遺伝子欠失型：SeV18+IN-1/ΔF）

ウィルスの再構成はLiらの報告（Li, H.-O. et al., J. Virology 74: 6564-6569 (2000), WO00/70070）に従って行った。F遺伝子欠失型ウイルスを再構成させるため、F蛋白のヘルパー細胞を利用した。当該ヘルパー細胞作製にはCre/loxP発現誘導システムを利用している。当該システムはCre DNA リコンビナーゼにより遺伝子産物を誘導発現するように設計されたプラスミドpCALNdLw (Arai, T. et al., J. Virol. 72: 1115-1121 (1988)) を利用したものであり、同プラスミドのトランスフォーマントにCre DNA リコンビナーゼを発現する組み換えアデノウィル

ス (AxCANCre) を Saito らの方法 (Saito, I. et al., Nucl. Acid. Res. 23, 3816-3821 (1995), Arai, T. et al., J. Virol. 72, 1115-1121 (1998)) で感染させて挿入遺伝子を発現させる。SeV-F蛋白の場合、F遺伝子を有する同トランスマーカー細胞を LLC-MK2/F7 と記載し、AxCANCre で誘導後 F蛋白を持続発現している細胞を LLC-MK2/F7/A と記載することにする。

F遺伝子欠失型SeV (SeV18+IN-1/ΔF) の再構成は、以下のようにして行った。則ち、LLC-MK2細胞を  $5 \times 10^6$  cells/dishで直径100mmのシャーレに播き、24時間培養後、PLWUV-VacT7を室温で1時間感染させた (MOI=2)。細胞を血清を含まないMEMで洗浄した後、プラスミド pSeV18+IN-1/ΔF, pGEM/NP, pGEM/P, pGEM/L及びpGEM/F-HNをそれぞれ12μg, 4μg, 2μg, 4μg及び4μg/dishの量比でOpti-MEMに懸濁し、1μg DNA/5μL相当のSuperFect transfection reagentを入れて混合し、室温で15分間放置後、最終的に3% FBSを含むOpti-MEM 3mLに入れ、細胞に添加して培養した。5時間培養後血清を含まないMEMで2回洗浄し、40μg/mLのAraC及び7.5μg/mLのTrypsinを含むMEMで培養した。24時間培養後、 $8.5 \times 10^6$  cells/dishあたりにLLC-MK2/F7/Aを重層し、40μg/mLのAraC及び7.5μg/mLのTrypsinを含むMEMで更に2日間37°Cで培養した。これらの細胞を回収し、ペレットを2mL/dishあたりの Opti-MEMに懸濁、凍結融解を3回繰り換えてP0 lysateを調製した。一方で、LLC-MK2/F7/Aを24 wellプレートに播き、ほぼコンフルエンスの時に32°Cに移し1日間培養した細胞を準備した。この細胞にSeV18+IN-1/ΔFのP0 lysateを各200μL/wellでトランスフェクションし、40μg/mLのAraC及び7.5μg/mLのTrypsinを含み血清を含まないMEMを用い32°Cで培養した。P1 培養上清を用いてP2以降、6 wellプレートに播いたLLC-MK2/F7/A細胞を用いて、同様の培養をP3までくり返した。

HA活性にてウィルスの増殖を確認したところ、P1以降のサンプルでHA活性の上昇が見られた。タイマーは、P3の4日目の試料 (P3d4) で  $2.7 \times 10^7$  CIU/mLであった。

### 5) RT-PCRによるウィルスゲノムの確認

伝播型 (SeV18+IN-1) のウィルス溶液 (P2 sample) からのウィルスRNAの回収は、QIAGEN QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN, Bothell, WA) を利用して行い、RT-PCRは1 stepでSuper Script One-Step RT-PCR with Platinum Taq Kit (Gibco-BRL, Rockville, MD) を利用して行った。RT-PCRは、SYN80F12/SYN80R1の組み合わせをプライマー対として使用して行った。目的の大きさの遺伝子の増幅が確認され、ウィルス遺伝子上にIN-1の遺伝子を搭載していることが確認された(図4パネルA)。

F遺伝子欠失型 (SeV18+IN-1/ΔF) についても同様の方法で行った。P3d4のサンプルを用いて、プライマーは、SYN80F12/SYN80R1の組み合わせで行った。この場合も目的の大きさの遺伝子の増幅が確認され、ウィルス遺伝子上にIN-1の遺伝子を搭載していることが確認された(図4パネルB)。

### 6) SeV搭載遺伝子に由来する蛋白質発現の確認

IN-1は、mouse IgMのκ型であるため、蛋白発現の確認にはWestern blottingの2次抗体であるHRP-cojugated anti-mouse IgG+IgM (Goat F(ab')2 Anti-Mouse IgG+IgM (AM14074) : BioSource International) を使用したWestern blottingでの検出を試みた(1次抗体無し)。

6 well plateでconfluentになったLLC-MK2にMOI 5でSeV18+IN-1或いはSeV18-IN-1/ΔFを感染した。感染2日後或いは4日後に培養上清を回収し、そのサンプルについては、PAGE prep Protein Clean-Up and Enrichment Kit (Pierce) を利用して濃縮と不純物の除去を行った。ネガティブコントロール(NC)として、GFP遺伝子を搭載した伝播型SeVベクターを同条件で感染し、回収した培養上清について上記と同様に調製しアプライした。300 μLの培養上清を処理し40 μLのSDS-sampleとして回収しその内の10 μL/laneでアプライしている。結果を図5に示したが、酸化条件で約47 kDa、還元条件で約30 kDaのバンドが検出された。アミノ酸配列から予想される分子量はH鎖が24.0 kDa、L鎖が23.4 kDaである。酸化条件ではH鎖

及びL鎖の結合状態で、還元条件では解離状態のH鎖及びL鎖の何れか一方のみが検出されていると判断され、Fabが形成されていることが確認された。

#### [実施例 2] IN-1遺伝子搭載SeVのin vitroにおける機能評価

IN-1は軸索伸長を抑制する因子NOGOに対する中和抗体であることが知られている (Chen, M. S. et al., Nature 403, 434-439 (2000))。そこで、IN-1のFab遺伝子を搭載したSeVの機能評価を行うには、軸索伸長の阻害を抑制する条件、則ち軸索伸長の阻害因子の存在下で伸長を促進する活性を観察する必要がある。阻害因子を含む脊髄抽出液をq-poolと呼び、その調製方法はSpillmannらが報告している方法 (Spillmann, A. A. et al., J. Biol. Chem. 273, 19283-19293 (1998)) に従って行った。成体ラット3体より脊髄を摘出し、1.5mgのq-poolを得た。IN-1活性の評価はChen及びSpillmannらの方法 (Chen, M. S. et al., Nature 403, 434-439 (2000)、Spillmann, A. A. et al., J. Biol. Chem. 273, 19283-19293 (1998)) に従った。方法としては2種の方法を採用し、マウス繊維芽細胞株 (NIH-3T3) の広がりとラット胎児後根神経節 (DRG: Dorsal Root Ganglion) 初代培養系における突起進展で評価した。

NIH-3T3を利用した評価のために、まずq-poolを約30  $\mu$ g/cm<sup>2</sup>相当となるようにPBSに希釈し96 well培養プレートに添加後、37°Cで2時間インキュベートした。PBSにて2回洗浄後細胞培養に使用した。q-poolで処理した（或いはq-poolで処理していない）96 well plateに1x10<sup>3</sup> cells/wellの割合でNIH-3T3細胞を播き、10%FBSを含むD-MEM培地を用いて培養を開始した。培養開始1日後に各種タイマーでSeVを感染し、感染2日後に形態学的観察と細胞数の評価を行った。細胞数評価にはAlamar Blue (BIOSOURCE International Inc. : California, USA) を利用した。形態学的に見ると、q-pool処理をしていないプレートで培養した細胞は、いわゆる繊維芽細胞様の形態をしているが、q-pool処理をしたプレートで培養した場合、球形の細胞が多く見られた（図6 (B)）。コントロールのSeVベクターであるGFP遺伝子を搭載したSeVベクター (SeV18+GFP) をq-pool処理した細胞に感染した

場合も、同様に球形の細胞が多く見られたが(図6(C))、IN-1遺伝子を搭載したSeVベクター(SeV18+IN1)をq-pool処理した細胞に感染した培養系においては、球形のものは少なく纖維芽細胞様の形態のものが多く見られた(図6(E))。則ち、既に報告されているように、q-poolによるNIH-3T3の形態変化を抑制するIN-1の機能が確認され、SeVベクター搭載遺伝子由来のIN-1が機能を有していると判断された。また、同系において、細胞数(細胞増殖)の観点からの評価を行った。q-poolでの処理を行っていないプレート、及び低濃度のq-poolで処理したプレートを用いた場合、SeV18+IN1を高MOIで感染した時(MOI=3, 10, 30)のみ、NIH-3T3の増殖を抑制する効果が観察された(図7(A)-(C))。形態観察において細胞に明らかな傷害が観察されないので、細胞傷害ではなく増殖抑制が観察されていると判断される。この観点では今までに報告はないが、IN-1の濃度が極端に高い場合にはこのような活性が表れる可能性は考えられる。また、この増殖抑制効果は、高濃度のq-poolで処理した場合には観察されなかった(図7(D))。則ち、この場合はIN-1の活性をq-poolが阻害したことになり、IN-1がq-poolの活性を阻害することを更に補完する結果になっていると考えられる。

もう一つのIN-1活性の評価として、ラットDRG初代培養系における突起進展への影響で評価した。この場合も、まずq-poolを約 $25\text{ }\mu\text{g/cm}^2$ 相当となるようにPBSに希釈し24 wellのtype I collagen-coated培養プレート(旭テクノグラス、千葉)に添加後、37°Cで2時間インキュベートした。PBSにて2回洗浄後細胞培養に使用した。胎生14日齢のSDラット(日本チャールスリバー、神奈川)より後根神経節を取り出し、終濃度100 ng/ml濃度の神経成長因子(NGF: Nerve Growth Factor、Serotec Ltd, U. K.)及び10% FBSを含むD-MEM培地でexplant cultureを行った。培養開始24時間後にSeV18+GFP或いはSeV18+IN1を $1\times 10^5$  CIU/500  $\mu\text{L}/\text{well}$ で感染した。感染36時間後に顕微鏡下で形態観察を行った。q-poolの処理をしないプレートにおいては、コントロールSeVであるSeV18+GFP感染細胞において突起伸展が見られたが(図8(A))、q-pool処理を行ったプレートにおいては、非常に僅かな突

起進展しか観察されなかつた（図8（C））。図8（B）及び図8（D）にはそれぞれ図8（A）及び図8（C）におけるSeV18+GFP感染の程度を視覚的に表すために、同視野におけるGFP蛍光写真を並記している。一方、q-pool処理を行つたプレートにおいても、SeV18+IN1感染細胞においては非常に顕著な突起進展が観察された（図8（E），（F））。則ち、突起進展の観点からも、q-poolによる神経細胞の突起進展阻害活性を抑制するIN-1の機能が確認され、SeVベクター搭載遺伝子由來のIN-1が機能を有していると判断された。

【実施例3】 ベクター発現持続性及びくり返し投与後発現評価のためのin vivo評価系

ベクター発現持続性及びくり返し投与の可能性評価のためには、より効率的で確実なin vivo評価系の確立が重要である。本実施例においては、新たに開発したマウス耳介投与による評価法を開示する。GFP遺伝子を有する伝播型SeVベクター（SeV18+GFP :  $5 \times 10^6$  GFP-CIU/5  $\mu$ L）或いはF遺伝子欠失型SeVベクター（SeV18+GFP/ΔF :  $5 \times 10^6$  GFP-CIU/5  $\mu$ L）をマウス耳介に投与すると、感染細胞に発現しているGFP蛋白の蛍光を非侵襲的に外部から観察可能であることが判明した（図9）。非侵襲的であるため、同一個体を利用して経時的にSeVベクター由來蛋白（GFP）の発現が観察でき、発現持続性の評価に非常に適していると考えられる。また、同一個体での経時変化を追えることは、実験に使用する動物個体数をかなり減少させることができる。実際の経時変化として、GFP蛋白の蛍光は投与2日目をピークに投与4日目まで観察可能であるが、投与5日目から6日目にほとんど消失した（図9）。

このGFP蛍光の変化が、SeVによる発現のKineticsを定量的に反映しているか否かを判定するために、Luciferase遺伝子を搭載している伝播型SeVベクター（SeV18+Luci : Yonemitsu, Y. et al., Nat. Biotech. 18, 970-973 (2000)）について同様に耳介投与を行つた。まず、投与タイマー依存的にLuciferase蛋白の活性の変化が見られることを確認した（図10（A））。次に、耳介内Luciferase蛋白

発現の経時的变化について定量し、投与2日目をピークに投与4日目に少し減少し、投与7日目及び11日目にほとんどベースラインレベルになることを確認した（図10(B)）。この時、同タイプのGFP遺伝子搭載SeV (SeV18+GFP) を投与した実験を同時に行い、GFP蛍光の経時変化を調べた。GFP蛍光の写真（図11(A)）から、画像処理ソフトAdobe Photoshop (Adobe Systems Incorporated, CA, USA) にて緑色蛍光を抽出した後、画像解析ソフトNIH image (National Institute of Health, USA) にて蛍光強度の定量（図11(B)）を行った。Luciferase活性から求めた経時変化（図10(B)）と蛍光強度から求めた経時変化（図11(B)）に非常に良い相関が見られた。則ち、GFP蛍光の変化はLuciferase活性の変化に良く一致しており、GFP蛍光の強度変化を追うことで、相対的定量性を議論できると判断された。

くり返し投与後の発現評価という観点からも検討を行った。右耳の耳介にSeV18+GFP/ΔF ( $5 \times 10^6$  GFP-CIU/5 μL) を投与し、発現を確認した後に、各種投与時期をずらして、左耳耳介への同じSeV18+GFP/ΔF ( $5 \times 10^6$  GFP-CIU/5 μL) を投与し、発現の有無を調べた（図12(A)）。また、この場合もGFP蛍光強度を定量化して表した（図12(B)）。右耳耳介感染1日後、及び2日後であれば、左耳耳介での感染及び発現が確認された。しかし、右耳感染4日後であれば、左耳耳介での感染程度がかなり減少し、右耳感染6日後であれば、左耳耳介での感染はほとんど成立しなかった。右耳感染8日後でも、左耳耳介での感染はほとんど成立しなかったが、感染62日後に僅かな感染が確認された。これらの現象については、SeVベクターの免疫系への影響を調べる良い材料になるとともに、くり返し投与後の発現を評価する非常に良い実験系になっていると考えられた。

次に、マウス耳介に投与した場合の感染細胞について調べた。マウス耳介にSeV18+ GFP/ΔF ( $5 \times 10^6$  CIU/5 μL) を投与し、感染2日後に耳介を切除し、凍結切片を作成し、蛍光顕微鏡下GFP蛍光を観察するとともに、抗GFP抗体 (Molecular Probes Inc., Eugene OR, USA) で染色した。GFP蛍光と抗GFP抗体での陽性細胞が

重なったのは真皮の細胞であった（図13）。他の個体の耳介組織で観察したところ、軟骨膜周辺（図14(A)）、軟骨膜に近い真皮（図14(B)）、表皮に近い真皮（図14(C)）等への感染が確認され、表皮及び弹性軟骨への感染はなかった。従って、本投与法にて感染する細胞は、耳介真皮及び軟骨膜（繊維芽細胞含む）であると判断された。

[実施例4] 抗CD28抗体（ $\alpha$  CD28）遺伝子を搭載したSeVベクターの構築

T細胞の活性化は抗原提示細胞のMHC class II(あるいはclassI)/抗原ペプチド複合体とT細胞レセプターの反応（第1シグナル）及びCD80(CD86)とCD28等の補助刺激分子の反応（第2シグナル(costimulatory signal)）により生じ、その後活性化したT細胞はCD80(CD86)とCTLA4等の抑制性補助刺激分子の反応により鎮静化される。これらcostimulatory signalをブロックすることにより末梢で免疫寛容が誘導されることが知られている。そこで生体内における治療用SeVベクターの搭載遺伝子産物の長期発現を実現するために、末梢での免疫寛容を誘導するcostimulatory signal関連遺伝子を阻害する抗体遺伝子搭載ベクターを例示する。CD28に対する抗体によってT細胞の活性化を阻害することにより免疫寛容を誘起するため、当該CD28に対する一本鎖抗体（ $\alpha$  CD28）遺伝子を搭載したF遺伝子欠失型SeVベクター（非伝播型）の構築を行った。

1) 遺伝子の全合成

$\alpha$  CD28遺伝子を搭載したSeVベクターを構築するため、当該遺伝子の全合成を実施した。Grosse-Hovest, L. らの報告している  $\alpha$  CD28遺伝子配列 (DDBJ database SYN507107) に基づき、 $\alpha$  CD28 (LV鎖及びHV鎖の一本鎖抗体) の遺伝子配列の両端にXbaI siteを設けて全合成を行い、この合成XbaI断片（配列番号：43）（この断片をSYN205-13と呼ぶ。両端の各6塩基はXbaI部位とした。 $\alpha$  CD28アミノ酸配列は配列番号：44に示した）を pBluescript II SK+ベクターに導入した (pBluescript/  $\alpha$  CD28)。合成に使用したoligo DNAの配列および名称を以下に示し、その配置を図15に示した。また、ベクター構築の概略図を図16に示した。

一方、mouse antibody  $\kappa$  L chainのシグナルペプチド（配列番号：46）とSeVのEIS配列との間にXbaI siteを有し、その両端にNheI/NotI siteを設けたDNA断片を作製した。このDNA断片のNheI siteとpGEM-4Zベクター（Promega）のXbaI siteをライゲーションさせたカセットプラスミド（pGEM-4Zcst）を構築した（配列番号：45、EIS配列を含むNotI断片のみ示した）。pBluescript/  $\alpha$  CD28の  $\alpha$  CD28遺伝子を含むXbaI断片をpGEM-4ZcstベクターのXbaI siteに導入し、上記シグナルペプチドとSeVのEIS配列を有する  $\alpha$  CD28遺伝子（ $\alpha$  CD28cst遺伝子）を構築した。ここで得られる  $\alpha$  CD28cst遺伝子を含むNotI断片の全長は6の倍数（6n）となるようにデザインしている。

表2 合成に使用したoligo DNAの配列および名称

SYN205F01（配列番号：47）

TCTAGAGACATCGAGCTCACTCAGTCTCCAGCTTCTTGGCTGTGTCTAGGGCAGAGAGGCCACCATCT

SYN205F02（配列番号：48）

AGGGCAGAGAGGCCACCATCTCCTGCAGAGCCAGTGAGAGTGTGAATATTATGTCACAAGTTAATGCAG

SYN205F03（配列番号：49）

ATGTCACAAGTTAATGCACTGGTACCAAGCAGAAGCCAGGACAGCCACCCAAACTCCTCATCTTGCTGC

SYN205F04（配列番号：50）

CCTTACACGTTGGAGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAACGGGGAGGCAGGCTCTGGCGGTGGCGGTGGCGGAT

SYN205F05（配列番号：51）

CGGTTCTGGCGGTGGCGGATCAGGTGGCGGAGGCTCGCAGGTGAAACTGCAGCAGTCTGGACCTGGCTG

SYN205F06（配列番号：52）

AGCAGTCTGGACCTGGCTGGTGACGCCCTCACAGAGCCTGTCCATCACTTGTACTGTCTCTGGGTTTC

SYN205F07（配列番号：53）

GACAACTCCAAGAGCCAAGTTTCTTAAAAATGAACAGTCTGCAAGCTGATGACACAGCCGTGATTACT

SYN205F08（配列番号：54）

TGACACAGCCGTGATTACTGTGCCAGAGATAAGGGATACTCCTATTACTATTCTATGGACTACTGGGGC

SYN205R01 (配列番号: 55)

TCTAGACGAGGAGACAGTGACCGTGGTCCCTGGCCCCAGTAGTCCATAGAAT

SYN205R02 (配列番号: 56)

ACTTGGCTCTGGAGTTGTCTTGCTGATGCTTTCTGGACATGAGAGCCGAATTATAATTGTGCCTC

SYN205R03 (配列番号: 57)

CGAATTATAATTGTGCCTCCACCCAGCCATATTACTCCCAGCCACTCCAGTCCCTGTCCCTGGAGACTGG

SYN205R04 (配列番号: 58)

GTCCCTGTCCCTGGAGACTGGCGAACCCAGTGAACACCATAGTCGCTTAATGAAAACCCAGAGACAGTACA

SYN205R05 (配列番号: 59)

CCCCCTCCGAACGTGTAAGGAACCTTCTACTTGCTGACAGAAATACATTGCAACATCATCCTCGTCCA

SYN205R06 (配列番号: 60)

TGCAACATCATCCTCGTCCACAGGATGGATGTTGAGGCTGAAGTTGTCCCAGACCCACTGCCACTAAC

SYN205R07 (配列番号: 61)

CAGACCCACTGCCACTAAACCTGGCAGGGACCCCAGATTCTACGTTGGATGCAGCAAAGATGAGGAGTT

2)  $\alpha$  CD28搭載F遺伝子欠失型SeV cDNA (pSeV18+  $\alpha$  CD28cst/  $\Delta$  F-GFP) の遺伝子構築

上記で構築したNotI断片の遺伝子配列を確認した後、このプラスミドから、同NotI断片を切り出し、green fluorescent protein (GFP) を搭載したF遺伝子欠失型SeV cDNA (pSeV18+  $\Delta$  F-GFP) (Li, H.-O. et al., J. Virol. 74(14) 6564-6569 (2000)) の+18位 (NotI部位) へ挿入し、pSeV18+  $\alpha$  CD28cst/  $\Delta$  F-GFPを構築した。

3)  $\alpha$  CD28搭載F遺伝子欠失型SeV (SeV18+  $\alpha$  CD28cst/  $\Delta$  F-GFP) の再構成

ウイルスの再構成はLiらの報告 (Li, H.-O. et al., J. Virology 74, 6564-

6569 (2000), WO00/70070) に従って行った。F遺伝子欠失型ウイルスを再構成させるため、F蛋白のヘルパー細胞を利用した。当該ヘルパー細胞作製にはCre/loxP発現誘導システムを利用している。当該システムはCre DNA リコンビナーゼにより遺伝子産物を誘導発現するように設計されたプラスミドpCALNdLw (Arai, T. et al., J. Virol. 72: 1115-1121 (1988)) を利用したものであり、同プラスミドのトランスフォーマントにCre DNAリコンビナーゼを発現する組み換えアデノウイルス (AxCANCre) をSaitoらの方法 (Saito, I. et al., Nucl. Acid. Res. 23, 3816-3821 (1995), Arai, T. et al., J. Virol. 72, 1115-1121 (1998)) で感染させて挿入遺伝子を発現させた。SeV-F蛋白の場合、F遺伝子を有する同トランスフォーマント細胞をLLC-MK2/F7と記載し、AxCANCreで誘導後F蛋白を持続発現している細胞をLLC-MK2/F7/Aと記載することにする。

SeV18+ $\alpha$  CD28cst/ΔF-GFPの再構成は、以下のようにして行った。則ち、LLC-MK2細胞を  $5 \times 10^6$  cells/dishで直径100mmのシャーレに播き、24時間培養後、PLWUV-VacT7を室温で1時間感染させた (MOI=2)。細胞を血清を含まないMEMで洗浄した後、プラスミドpSeV18+ $\alpha$  CD28cst/ΔF-GFP, pGEM/NP, pGEM/P, pGEM/L及びpGEM/F-HNをそれぞれ12 $\mu$ g, 4 $\mu$ g, 2 $\mu$ g, 4 $\mu$ g及び4 $\mu$ g/dishの量比でOpti-MEMに懸濁し、1 $\mu$ g DNA/5 $\mu$ L相当のSuperFect transfection reagentを入れて混合し、室温で15分間放置後、最終的に3% FBSを含むOpti-MEM 3 mLに入れ、細胞に添加して培養した。5時間培養後血清を含まないMEMで2回洗浄し、40 $\mu$ g/mLのAraC及び7.5 $\mu$ g/mLのTrypsinを含むMEMで培養した。24時間培養後、 $8.5 \times 10^6$  cells/dishあたりにLLC-MK2/F7/Aを重層し、40 $\mu$ g/mLのAraC及び7.5 $\mu$ g/mLのTrypsinを含むMEMで更に2日間37°Cで培養した。これらの細胞を回収し、ペレットを2mL/dishあたりの Opti-MEMに懸濁、凍結融解を3回繰り換えてP0 lysateを調製した。一方で、LLC-MK2/F7/Aを24 wellプレートに播き、ほぼコンフルエントの時に32°Cに移し1日間培養した細胞を準備した。この細胞にSeV18+ $\alpha$  CD28cst/ΔF-GFPのP0 lysateを各200 $\mu$ L/wellでトランスフェクションし、40 $\mu$ g/mLのAraC及

び7.5  $\mu$ g/mLのTrypsinを含み血清を含まないMEMを用い32°Cで培養した。P1 培養上清を用いてP2以降、6 wellプレートに播いたLLC-MK2/F7/A細胞を用いて、同様の培養をP3までくり返した。

P3の5日目の試料 (P3d5) のウイルス力価は $7 \times 10^6$  CIU/mLであった。

#### 4) RT-PCRによるウイルスゲノムの確認

F遺伝子欠失型SeVであるSeV18+ $\alpha$ CD28cst/ΔF-GFPのウイルス溶液 (P3 sample) からのウイルスRNAの回収は、QIAGEN QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN, Bothell, WA) を利用して行い、RT-PCRは1 stepでSuper Script One-Step RT-PCR with Platinum Taq Kit (Gibco-BRL, Rockville, MD) を利用して行った。RT-PCRは、F6 (5'-ACAAGAGAAAAACATGTATGG-3') / R199 (5'-GATAACAGCACCTCCTCCCGACT-3') (それぞれ配列番号: 62および63) の組み合わせをプライマー対として使用して行った。目的の大きさの遺伝子の増幅が確認され、ウイルス遺伝子上に $\alpha$ CD28cst遺伝子が搭載されていることが確認された (図17)。

#### 5) SeV搭載遺伝子に由来する蛋白質発現の確認

6 well plateでconfluentになったLLC-MK2にMOI 1で SeV18+ $\alpha$ CD28cst/ΔF-GFPを感染し、血清を含まないMEM培地1mlを添加して37°C (5% CO<sub>2</sub>存在下) で培養した。感染1日後にMEM培地を交換し、4日後に培養上清を回収して試料とした。ネガティブコントロール (NC) として、GFP遺伝子を搭載したF遺伝子欠失型SeVベクター (SeV18+GFP/ΔF) を同条件で感染して、培養上清を回収した。試料は、PAGE prep Protein Clean-Up and Enrichment Kit (Pierce) を用いて、300  $\mu$ Lの培養上清を40  $\mu$ Lに濃縮し、これをSDS PAGE電気泳動用の試料としてWestern blottingは5  $\mu$ L/laneでアプライした。一方、Coomassie Brilliant Blue (CBB) 染色には、同様の操作で600  $\mu$ Lの培養上清を40  $\mu$ Lに濃縮し、これを10  $\mu$ L/laneでアプライして試験を行った。Western blottingの検出用の抗体にはAnti-mouse Ig, horseradish peroxidase linkedwhole antibody (from sheep) (Amersham Bioscience) を使用した。結果を図18に示す。約29 kDaのバンドが検出され、

アミノ酸配列から予想される分子量と一致した。

[実施例 5] 抗CD28抗体遺伝子搭載SeVのin vivoにおける発現持続性の評価

構築した抗CD28抗体 ( $\alpha$  CD28cst) 遺伝子搭載F遺伝子欠失型SeV (SeV18+ $\alpha$  CD28cst/ΔF-GFP) の機能評価の一環として、in vivoにおける発現持続性を評価した。この時、抗CD28抗体遺伝子を搭載せずGFP遺伝子を搭載しているF遺伝子欠失型SeV (SeV18+GFP/ΔF) をコントロールとして持続性の差を調べた。またこの時、感染初期には $\alpha$  CD28cst蛋白の発現はない（非常に少ない）ことからその時期の蛋白の発現を補うことを目的として、 $\alpha$  CD28cst蛋白と同様の機能が期待されるCTLA4-Ig蛋白質を、SeV投与当日に投与した系も評価した。CTLA4-Ig蛋白質は市販されており (Ancell Corporation) 使用可能であるが、今回は既に報告されているものと類似の方法で調製したものを使用した (Iwasaki, N. et al., Transplantation 73(3) 334-340 (2002); Harada, H. et al., Urol. Res. 28(1) 69-74 (2000); Iwasaki, N. et al., Transplantation 73(3) 334-340 (2002); Glysing-Jensen, T. et al., Transplantation 64(12) 1641-1645 (1997))。

発現持続の評価は、実施例3に示したマウス耳介投与による評価法にて行った。GFP遺伝子を有するSeVベクターをマウス耳介に投与すると、感染細胞に発現しているGFP蛋白の蛍光を非侵襲的に外部から観察可能である。この系を用いることにより、同一個体を利用して経時的にSeVベクター由来発現蛋白 (GFP) の発現が観察でき、発現持続性の評価に非常に適している。GFP遺伝子搭載F遺伝子欠失型SeVベクター (SeV18+GFP/ΔF : 5x10<sup>6</sup> CIU/5 μL) 或いはGFP遺伝子とともに抗CD28抗体遺伝子を搭載しているF遺伝子欠失型SeVベクター (SeV18+ $\alpha$  CD28cst/ΔF-GFP : 5x10<sup>6</sup> CIU/5 μL) をマウス耳介に投与し、経時的にGFP蛋白の発現を観察した。更に、両投与群の一部のマウスには、SeV感染1時間後及び10時間後に、CTLA4-Ig蛋白質を0.5 mg/bodyで腹腔内に投与した (それぞれn=2)。まず、補助刺激因子抑制を目的とした抗体遺伝子 (この場合は $\alpha$  CD28cst) を搭載したSeVベクターがin vivoでも感染することが確認された (図19)。SeV18+GFP/ΔFとはGFP発現量

に差が見られるが、この点については後述する。持続性に関しては、SeV18+ $\alpha$  CD28cst/ΔF-GFP投与群で、非常に僅かながら対照に比べGFP蛋白の発現持続が観察された。則ち、SeV18+GFP/ΔF投与群では、投与5日後までは明らかなGFP発現が見られるものの、投与6日後にほとんど見えなくなる様な急激な消失が観察されるのに対して、SeV18+ $\alpha$  CD28cst/ΔF-GFP投与群では、その減少が僅かながら緩やかであり、投与6日後でもGFP蛋白の蛍光が観察された（図19）。SeV感染当日のCTLA4-Ig蛋白質の投与効果もはっきりと表れた。CTLA4-Ig蛋白質を投与することにより、SeV18+GFP/ΔF投与群、SeV18+ $\alpha$  CD28cst/ΔF-GFP投与群とともにGFP蛋白発現の増強が観察され、更にSeV18+ $\alpha$  CD28cst/ΔF-GFP投与群においては、感染6日後でも比較的はっきりとしたGFP蛋白の蛍光が観察された（図20）。GFP蛍光の写真から、画像処理ソフトAdobe Photoshop (Adobe Systems Incorporated, CA, USA) にて緑色蛍光を抽出した後、画像解析ソフトNIH image (National Institute of Health, USA) にて蛍光強度を定量化した結果を図21に示した。CTLA4-Ig蛋白質を投与した場合のGFP蛋白発現の増強とともに、僅かではあるが $\alpha$  CD28cst遺伝子を搭載することによるSeV搭載遺伝子由来蛋白（この場合はGFP）発現持続への効果が確認された。この結果は、補助刺激因子活性を抑制することによるSeV感染及びその持続性への効果を表すものであり、当該コンセプトの確かさを意味している。また、SeVベクターの感染だけでは発現の持続への影響は少なっても、感染初期に同メカニズムを期待する蛋白を同時投与することで、発現の持続を延長し得る可能性を示している。

SeV18+ $\alpha$  CD28cst/ΔF-GFP投与群において、SeV18+GFP/ΔF投与群よりもGFP蛋白の蛍光が弱かったことについて、以下in vitroの系で確認を行った。LLC-MK2細胞にSeV18+GFP/ΔF或いはSeV18+ $\alpha$  CD28cst/ΔF-GFPをMOI=5で感染し、経時的に蛍光顕微鏡下でGFP蛋白の発現を観察した（図22）。感染16時間後ではSeV18+GFP/ΔF感染細胞ではGFPが観察されるのに対して、SeV18+ $\alpha$  CD28cst/ΔF-GFP感染細胞では観察されなかった。SeV18+ $\alpha$  CD28cst/ΔF-GFP感染細胞では、感染24時間後以降

発現したGFP蛋白の蛍光が観察されるものの、SeV18+GFP/△F感染細胞よりも常に弱く、発現量が低いことが確認された。SeVにおいてはゲノム搭載遺伝子の発現量の違いについて、極性効果が知られている (Glazier, K. et al., J. Virol. 21 (3), 863-871 (1977); Homann, H.E. et al., Virology 177 (1), 131-140 (1990))。則ち、RNA polymeraseのrestart効率が高くないために、ゲノムの3'端に搭載した遺伝子ほど発現量が高く、5'端のものほど発現量は低くなる。実際に同じマーカー遺伝子を様々な位置に搭載することで、極性効果を証明するとともに発現量制御のデザインが示されている (Tokusumi, T. et al., Virus Res 86, 33-38 (2002))。今回検出に利用しているGFP遺伝子は、SeV18+GFP/△Fでは3'端に、SeV18+αCD28cst/△F-GFPでは欠失しているF遺伝子の位置に搭載しており、GFP蛋白量はSeV18+GFP/△Fで高く、SeV18+αCD28cst/△F-GFPでは相対的に低くなるデザインになっている。但し、他のSeV蛋白は両ベクターで同様に（同量程度）発現していると予想されることから、免疫原性の原因となる蛋白は同量程度で、検出蛋白（GFP）のみSeV18+αCD28cst/△F-GFP感染細胞で少なくなっていると考えられる。以上のことから、耳介投与系において、SeV18+αCD28cst/△F-GFP投与群で確認された僅かながらの遺伝子発現の延長に関して、実際にはGFP観察で予想されるよりも更に延長効果があることが示唆される。

#### 産業上の利用の可能性

本発明により、抗体可変領域を含むポリペプチドを発現するパラミクソウイルスベクターが提供された。本発明のベクターは、インビボまたはエクスビボにより生体内に投与するための遺伝子治療ベクターとして適している。特に神経伸長阻害因子に対する抗体断片を発現するベクターは、神経損傷への遺伝子治療に有用である。また、免疫活性化シグナル伝達を阻害する抗体を発現する本発明のベクターは、ベクターからの遺伝子の長期発現および繰り返し投与を可能にする。

## 請求の範囲

1. 抗体可変領域を含むポリペプチドをコードするパラミクソウイルスベクター。
2. パラミクソウイルスがセンダイウイルスである、請求項1に記載のウイルスベクター。
3. 該ポリペプチドが分泌型である、請求項1に記載のウイルスベクター。
4. 抗体のH鎖可変領域を含むポリペプチド、および抗体のL鎖可変領域を含むポリペプチドをコードしている、請求項1に記載のパラミクソウイルスベクター。
5. 抗体のH鎖可変領域を含むポリペプチド、および抗体のL鎖可変領域を含むポリペプチドが、互いに結合してF a bを構成する、請求項4に記載のウイルスベクター。
6. 抗体可変領域の少なくとも1つがリガンドまたは受容体に対する抗体に由来する、請求項5に記載のウイルスベクター。
7. 抗体が神経細胞の生存、分化、または神経突起伸長を阻害する蛋白質に結合する、請求項6に記載のウイルスベクター。
8. 抗体がNOGOに対する抗体である、請求項7に記載のウイルスベクター。
9. 抗体が免疫シグナル伝達の受容体またはそのリガンドに対する抗体である、請求項6に記載のウイルスベクター。
10. 抗体が、T細胞または抗原提示細胞の表面に発現する受容体またはそのリガンドに対する抗体である、請求項9に記載のベクター。
11. 該受容体またはそのリガンドが、T細胞または抗原提示細胞のコスティミュラトリーシグナルのシグナル伝達分子である、請求項10に記載のベクター。
12. 該シグナル伝達分子が、CD28、CD80、CD86、LFA-1、ICAM-1 (CD54)、PD-1、および ICOS からなる群より選択される分子である、請求項11に記載のベクター。

ター。

13. さらに他の外来遺伝子をコードしている、請求項9に記載のベクター。

14. 抗体可変領域を含む組み換えポリペプチドの製造方法であって、

(a) 請求項1に記載のウイルスベクターを哺乳動物細胞に導入する工程、および

(b) 該ベクターが導入された哺乳動物細胞またはその培養上清から、產生されたポリペプチドを回収する工程、を含む方法。

15. 請求項14に記載の方法により製造されたポリペプチド。

16. 神経形成を促進する方法であって、神経を形成させる必要がある部位に請求項7に記載のベクターを送達する工程を含む方法。

17. 脊髄損傷の治療方法であって、該損傷部位に請求項7に記載のベクターを送達する工程を含む方法。

18. 請求項9に記載のベクターを投与する工程を含む、免疫反応を抑制する方法。

19. 免疫シグナル伝達の受容体またはそのリガンドに対する抗体、あるいはCTLA4またはその断片を投与する工程をさらに含む、請求項18に記載の方法。

20. ベクターからの遺伝子の発現を持続させるおよび/またはベクターの繰り返し投与によるベクターからの遺伝子の発現を増強する方法であって、請求項9に記載のベクターを投与する工程を含む方法。

21. 免疫シグナル伝達の受容体またはそのリガンドに対する抗体、あるいはCTLA4またはその断片を投与する工程をさらに含む、請求項20に記載の方法。

22. 発現持続性が上昇したベクター組成物であって、請求項9に記載のベクターおよび薬学的に許容される担体を含む組成物。

23. 遺伝子導入キットであって、(a) 請求項9に記載のベクター、ならびに(b) 免疫シグナル伝達の受容体またはそのリガンドに対する抗体あるいはCTLA4またはその断片、を含むキット。

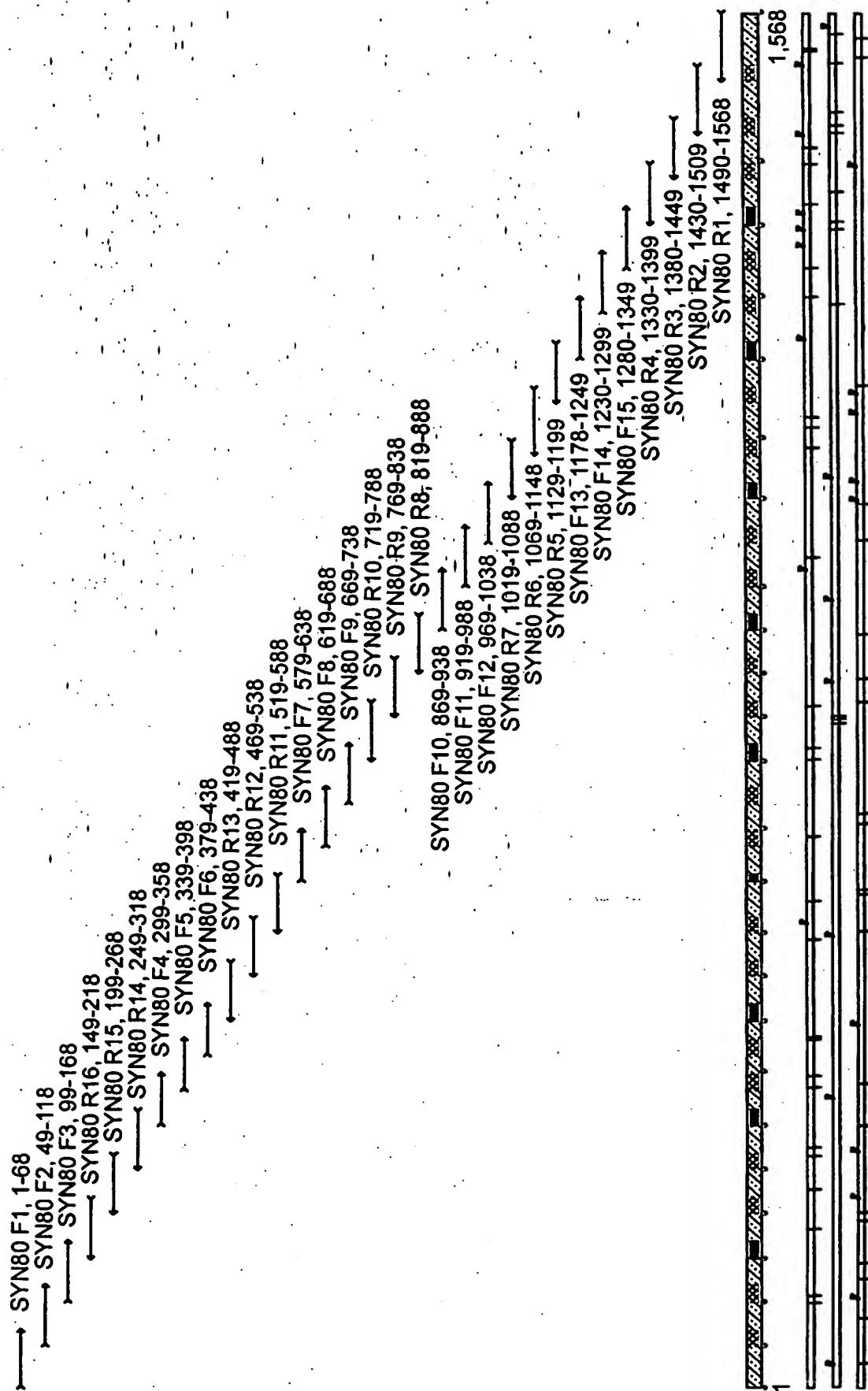
図 1

gcggccgcgtacggccATGAAAAGACAGCTATCGCGATTGCAGTGGCACTGGCTGGTT  
TCGCTACCGTAGCGCAGGCCGAAGTAAACTGCATGAGTCAGGGCCTGGCTGGTAAGGC  
CTGGGACTTCAGTGAAGATATCCTGCAAGGCTCTGGCTACACCTCACTAACTACTGGC  
TAGGTTGGGTAAAGCAGAGGCCTGGACATGGACTTGAGTGGATGGAGATATTACCTG  
GAGGTGGTTACTAACTACAATGAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACACTGACTGCAGACA  
CATCCTCCAGCACTGCCTACATGCAGCTCAGTAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCTGTCT  
ATTCTGTGCAAGATTTACTACGGTAGTAGCTACTGGTACTTCGATGTCTGGGCCAAG  
GCACCACGGTCACCGTCTCCTCAGCAAAGACCACTCCTCCGTCTGTTACCTCTGGCTC  
CTGGTTCTGCGGCTCAGACTAACTCTATGGTACTCTGGATGCCTGGTCAAGGGCTATT  
TCCCTGAGGCCAGTGACAGTGACCTGGAACCTGGATCCCTGTCCAGCGGTGTGCACACCT  
TCCCAGCTGTCTGCAATCTGACCTCTACACTCTGAGCAGCTCAGTGACTGTCCCCCTCCA  
GCACCTGGCCCAGCGAGACCGTCACCTGCAACGTTGCCACCCGGCTCTAGCACCAAAG  
TTGACAAGAAAATCGTACCGCGCGACTGCTAACCGtagtaaaaaacttaqqqtqaaaq  
ttcatcgccqaccgtacggccATGAAACAAAGCACTATTGCACTGGCACTCTTACCGTTAC  
TGTGTTACCCCTGTGACAAAAGCCGACATCGAGCTCACCGAGTCTCCAGCAATCATGGCTG  
CATCTGTGGAGAAACTGTACCACATCACATGTGGAGCAAGTGAGAATATTACGGTGCTT  
TAAATTGGTATCAGCGGAAACAGGGAAAATCTCCTCAGCTCCTGATCTATGGTCAACCA  
ACTTGGCAGATGGCATGTCACTGAGGTTAGTGGCAGTGGATCTGGTAGACAGTATTCTC  
TCAAGATCAGTAGCCTGCATCCTGACGATGTGCAACGTATTACTGTAAAATGTGTTAA  
GTACTCCTCGGACGTTGGAGCTGGGACCAAGCTCGAGCTGAAGCGCGCTGATGCTGCAC  
CGACTGTATCCATCTCCCACCATCCAGTGAGCAGTTAACATCTGGAGGTGCCTCAGTCG  
TGTGCTTCTGAACAACTTCTACCCCAAAGACATCAATGTCAAGTGGAGATTGATGGCA  
GTGAACGACAAAATGGCGTCTGAACAGTTGGACTGATCAGGACAGCAAAGACAGCACCT  
ACAGCATGAGCAGCACCTCACGTTGACCAAGGACGAGTATGAACGACATAACAGCTATA  
CCTGTGAGGCCACTCACAAGACATCAACTCACCCATTGTCAAGAGCTCAACAGGAATG  
AGTGTAGTccgtagtaaaaaacttaqqqtqaaagtcatgcggccgc

2 / 22

2

图 3



4/22

図4

A

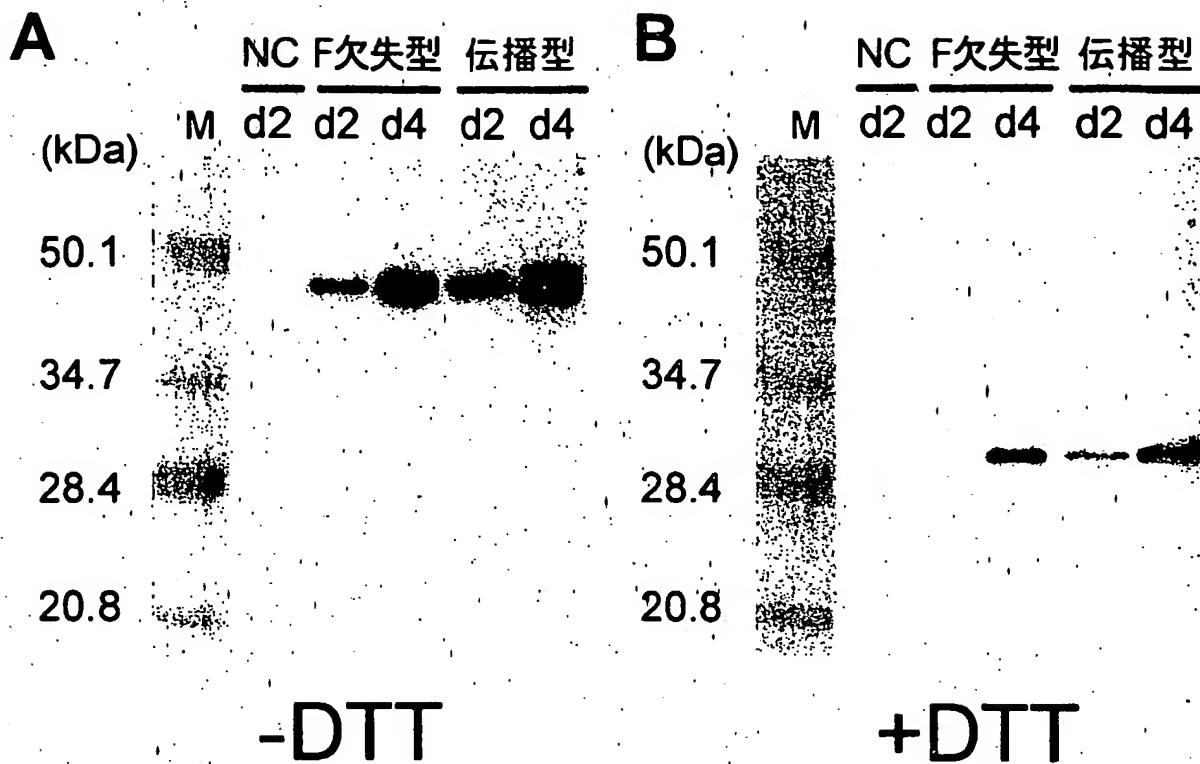


B



5/22

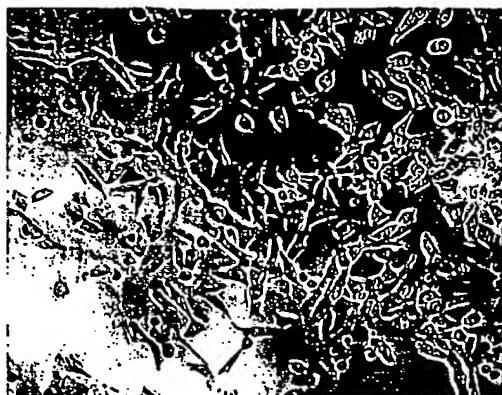
図5



6 / 22

図6

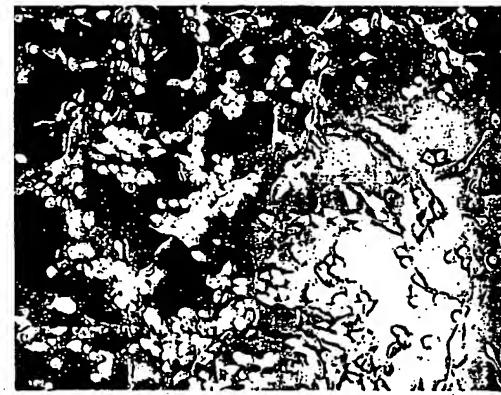
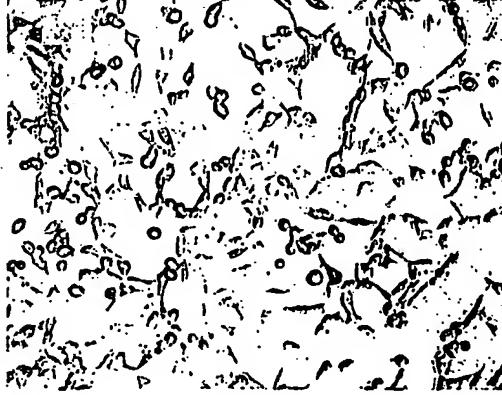
(A) — q-pool



(B) + q-pool

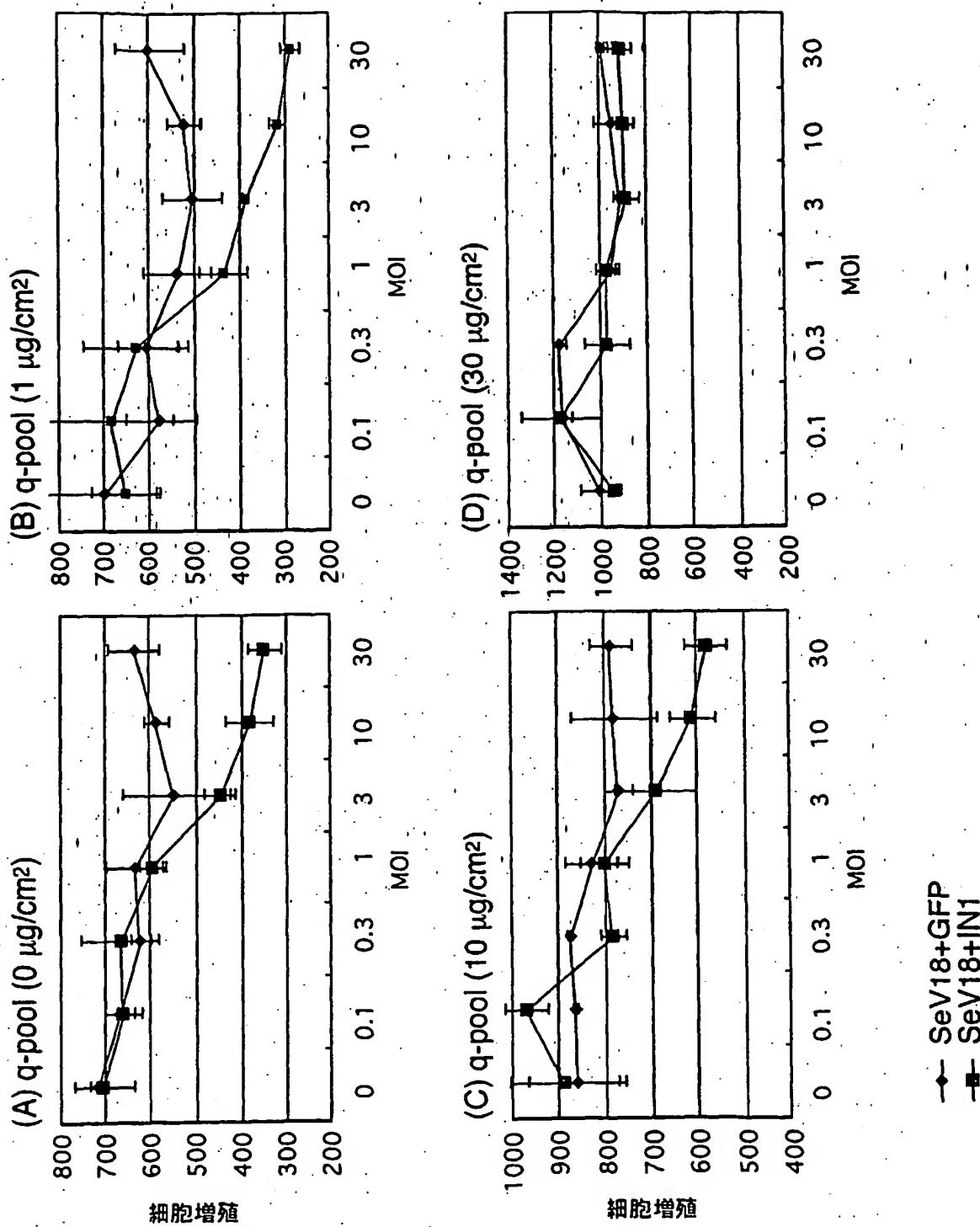
(C) + q-pool: SeV<sup>18+</sup>GFP

(D)

(E) + q-pool: SeV<sup>18+</sup>IN-1

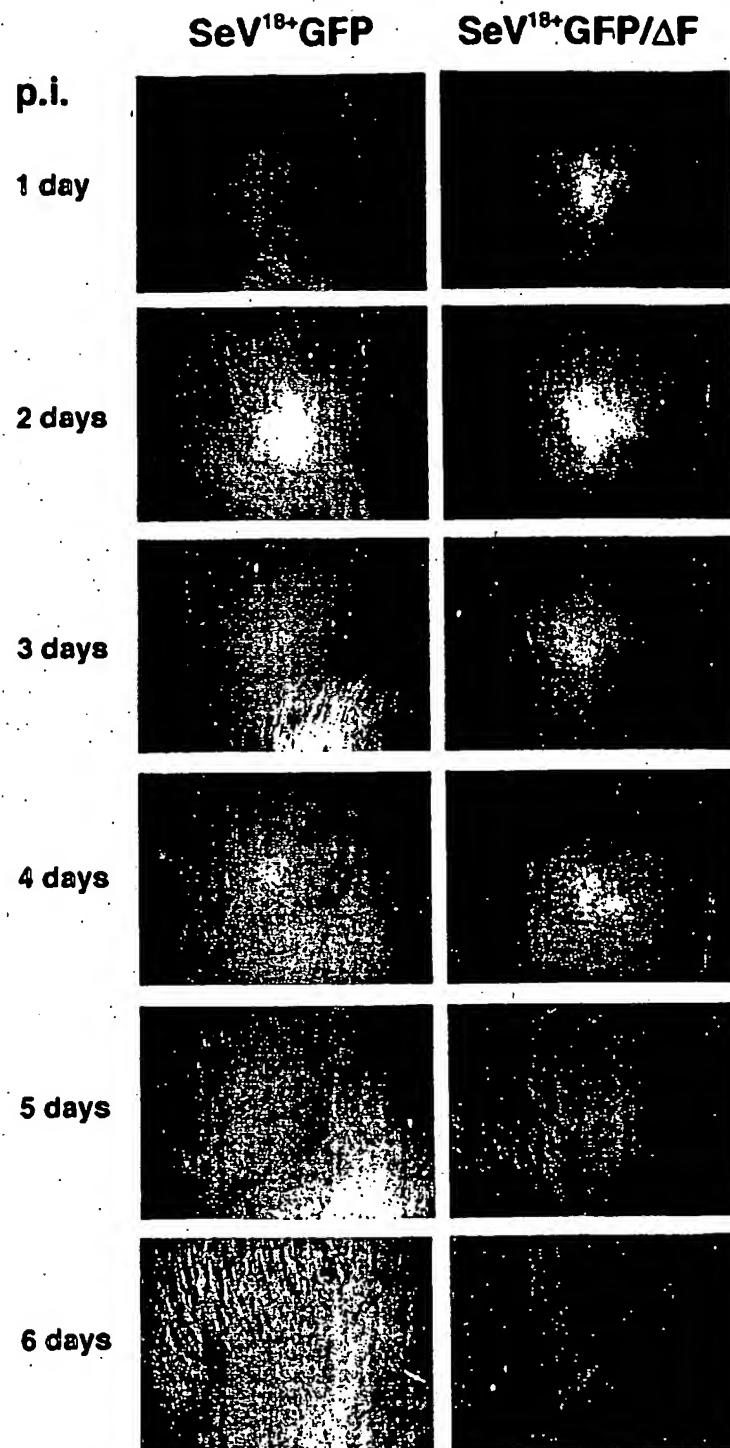
7/22

図 7



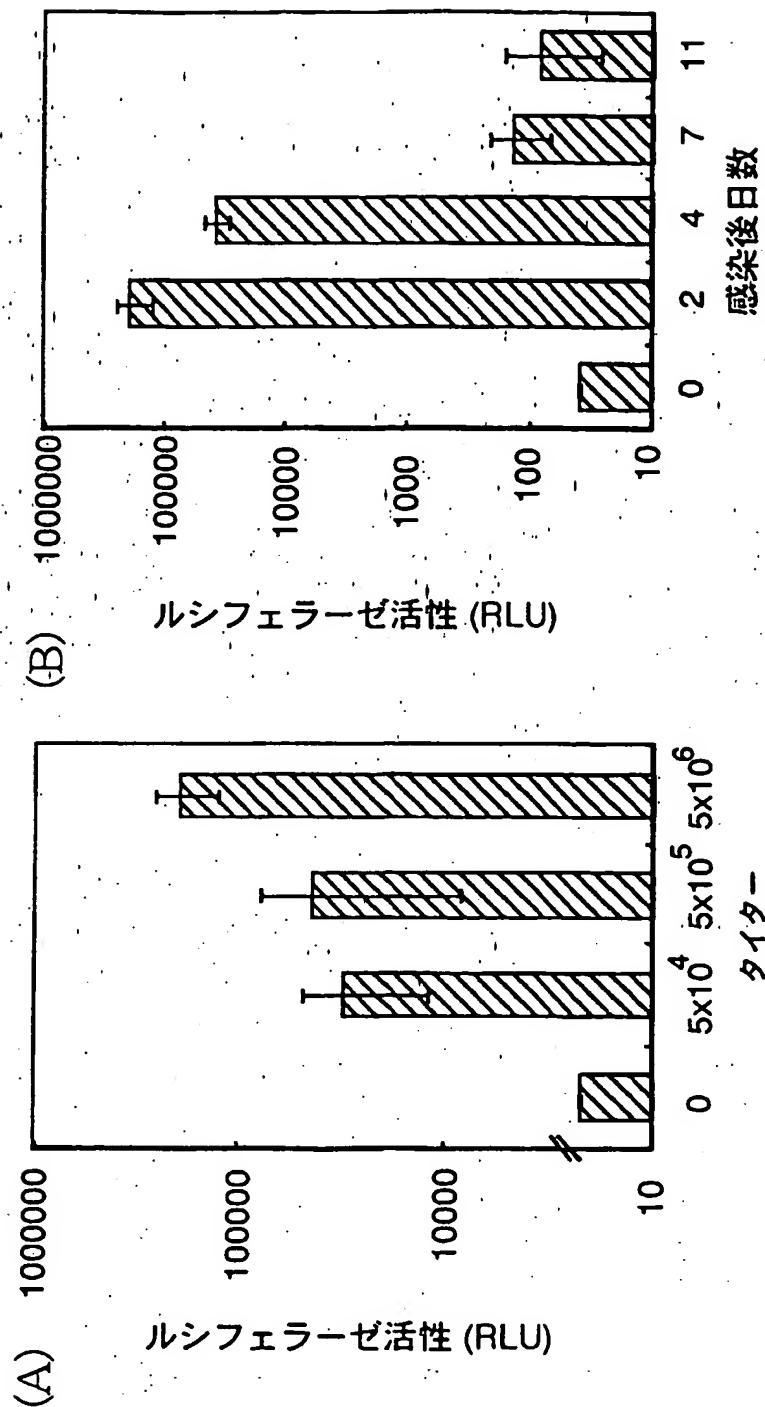
9 / 22

☒ 9



10/22

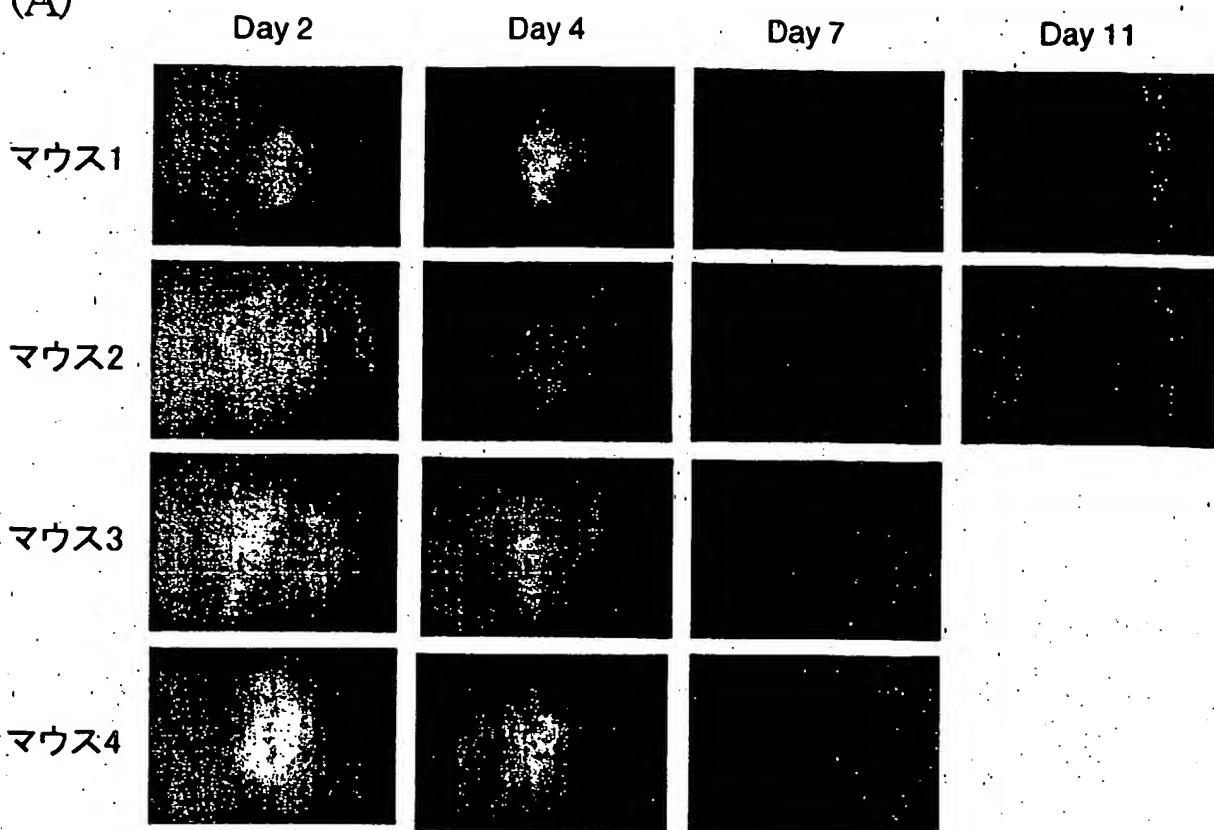
図10



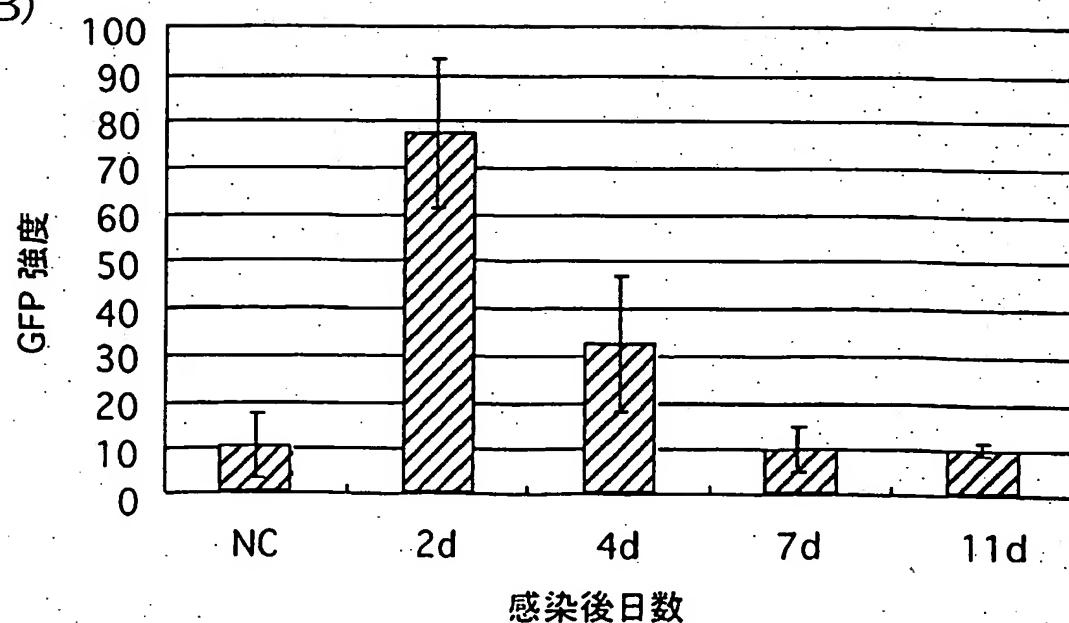
11/22

図11

(A)

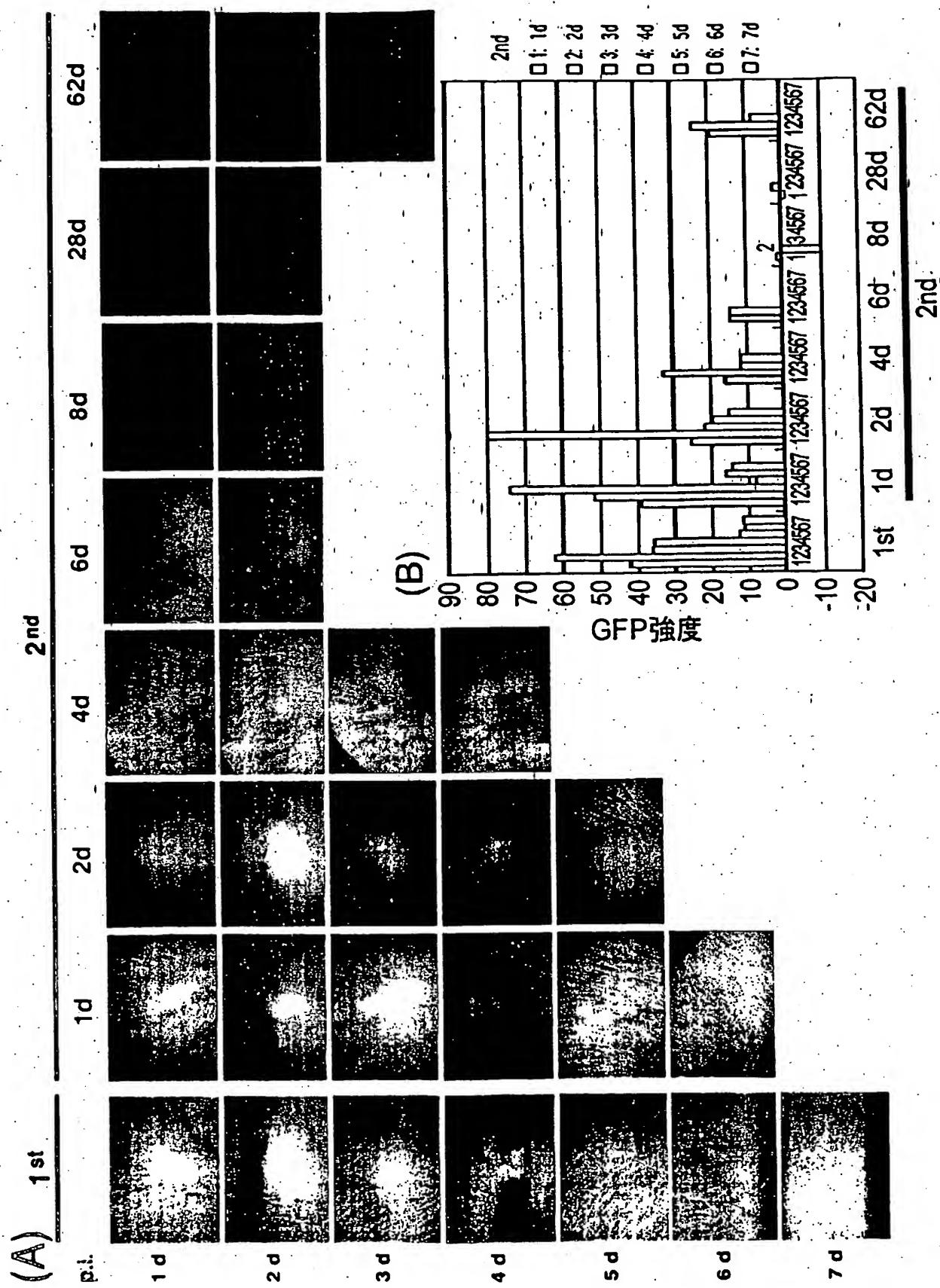


(B)



12 / 22

図 12



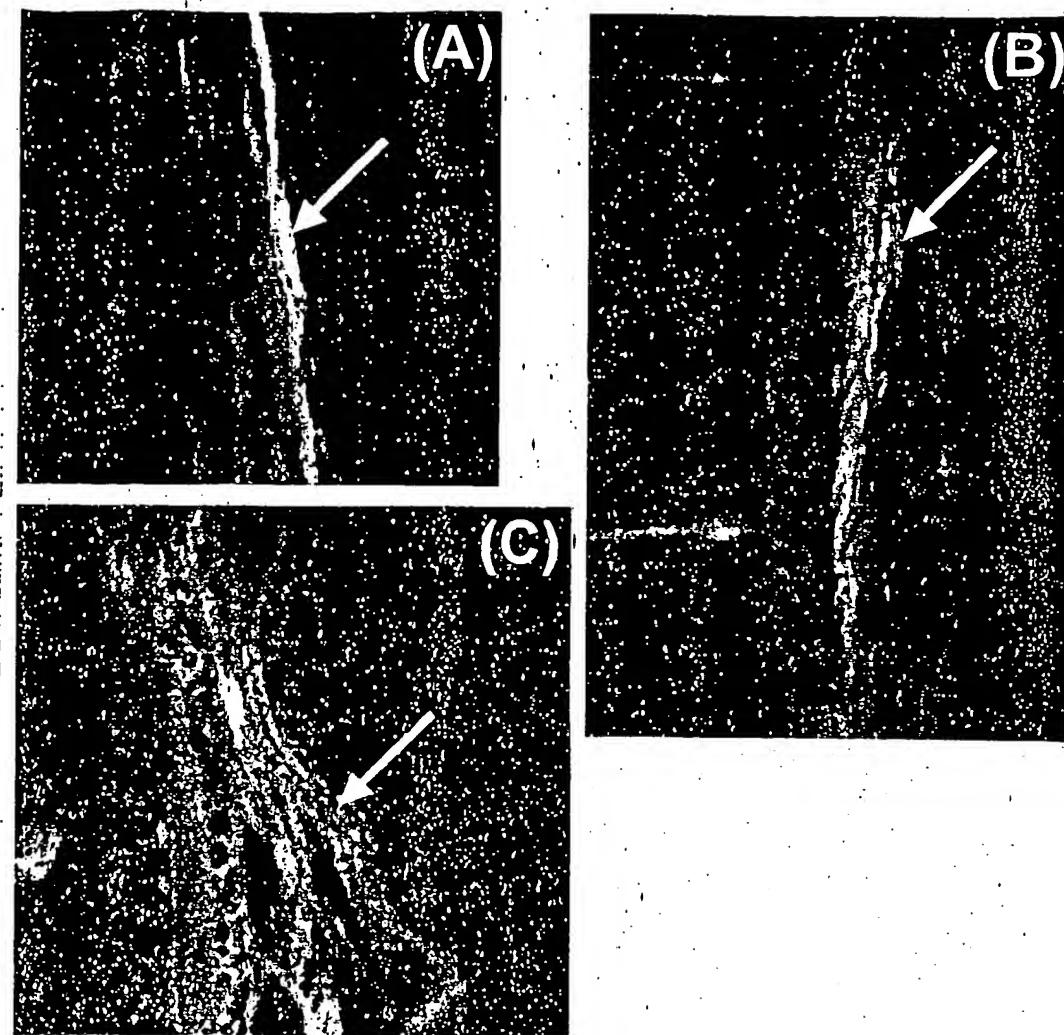
13 / 22

図13

(A) GFP 蛍光 (B) 重ね合わせ (C) 抗GFP

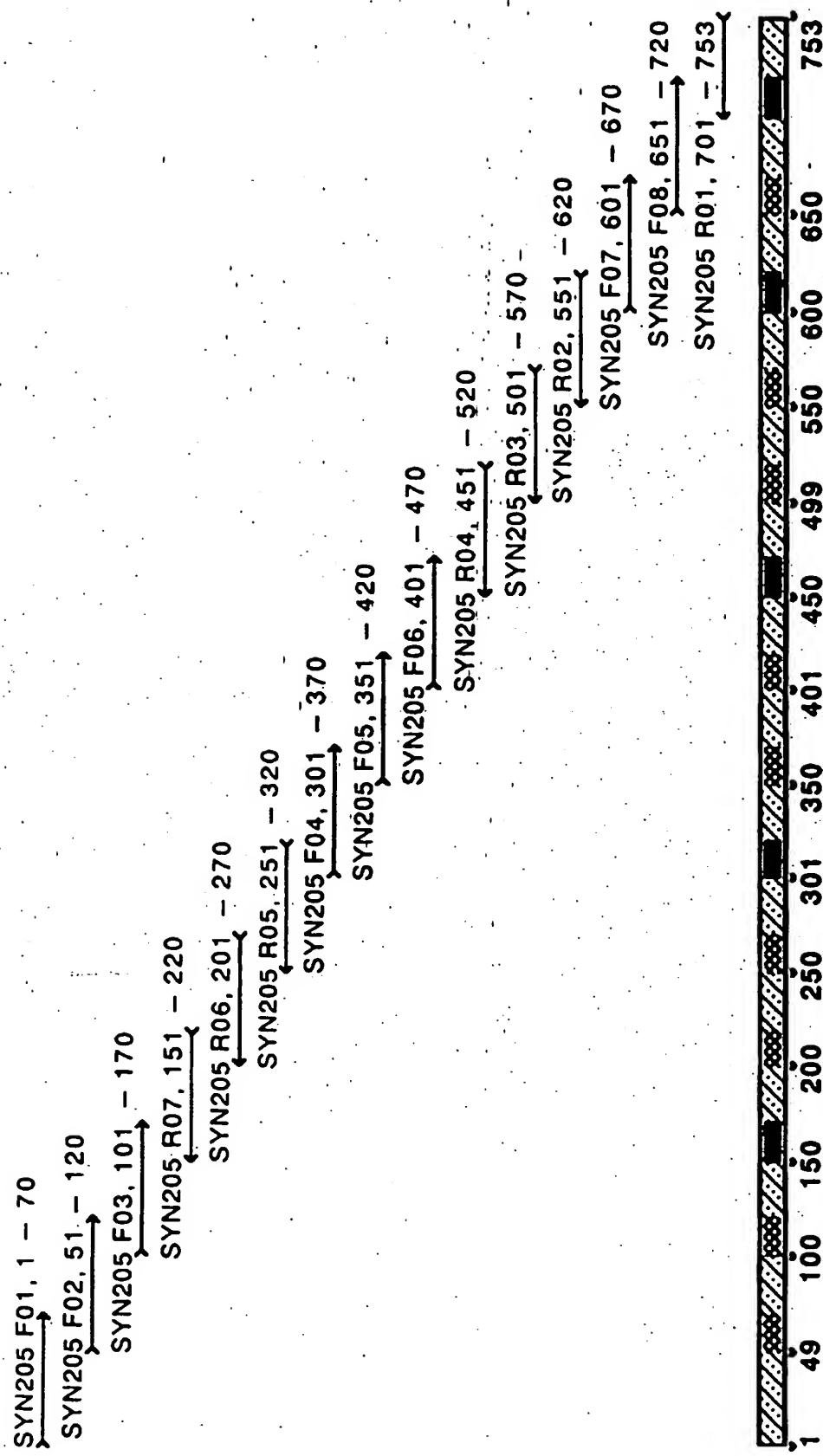


図14



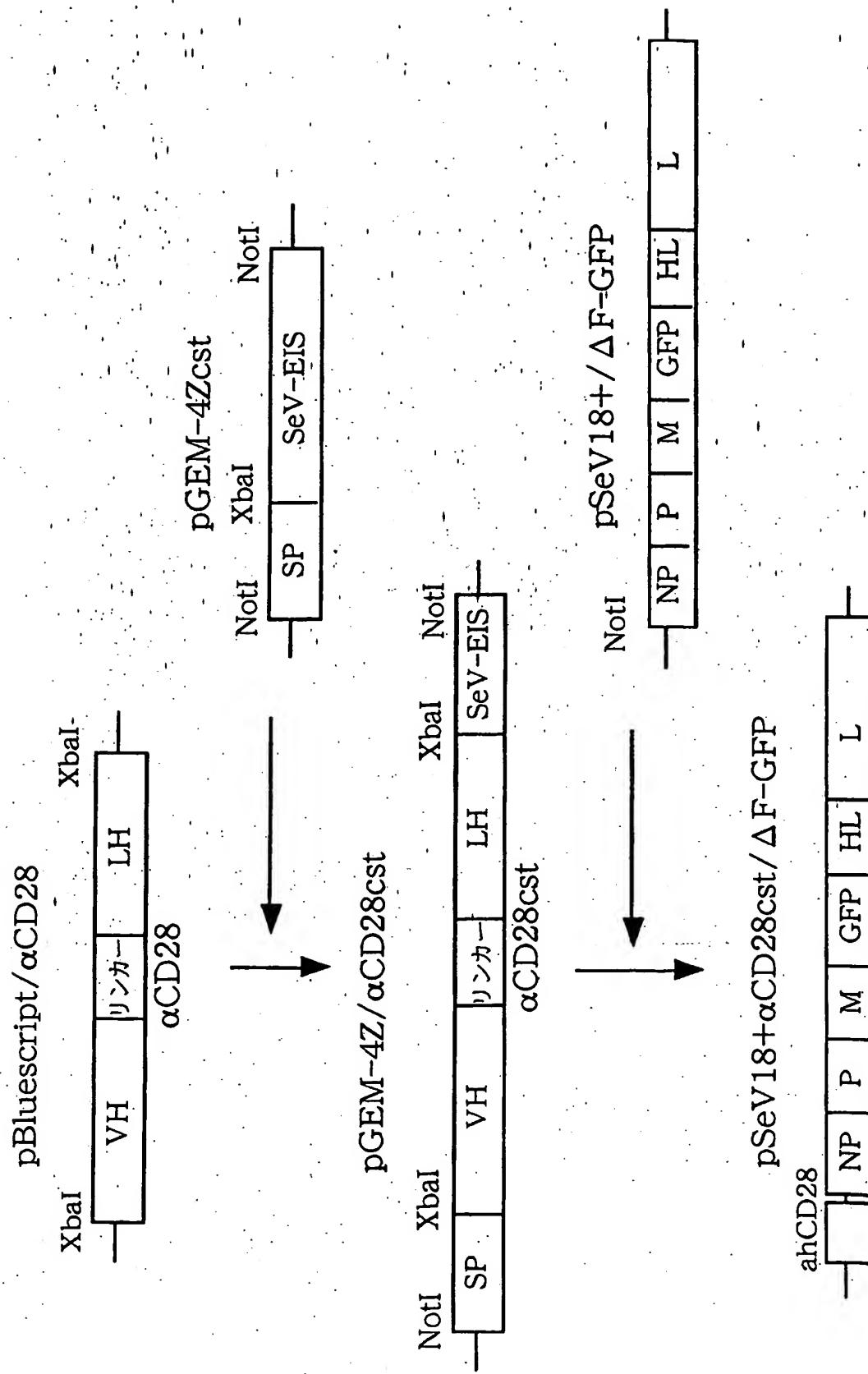
15 / 22

図15



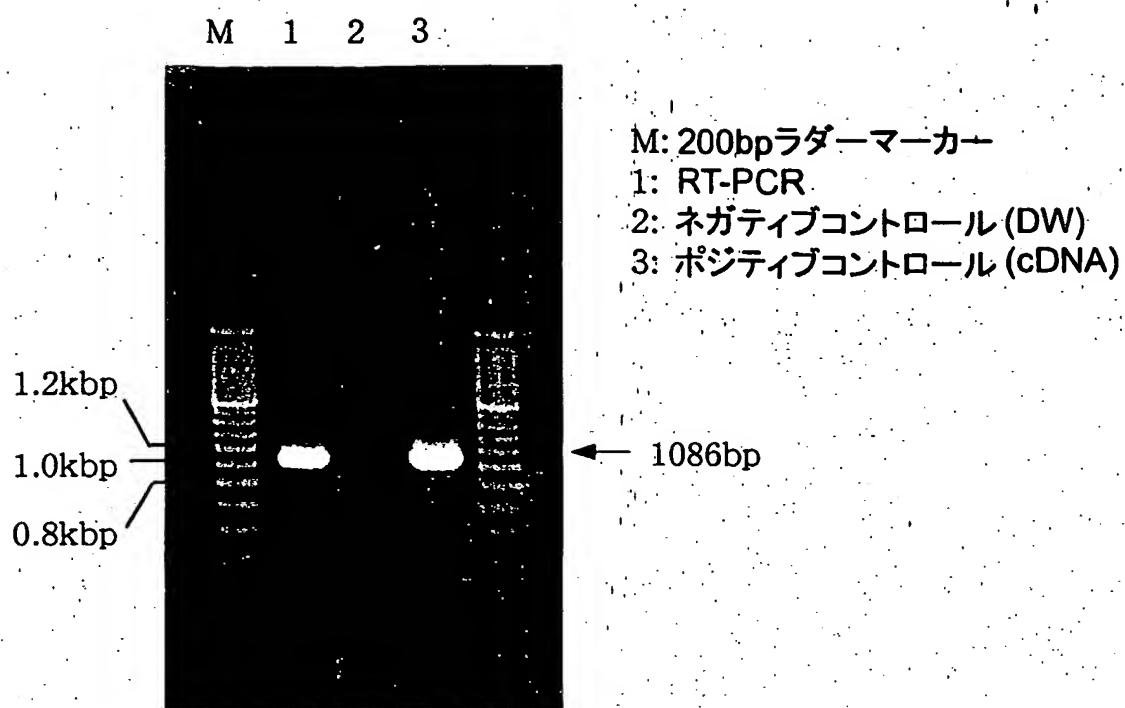
16/22

図16



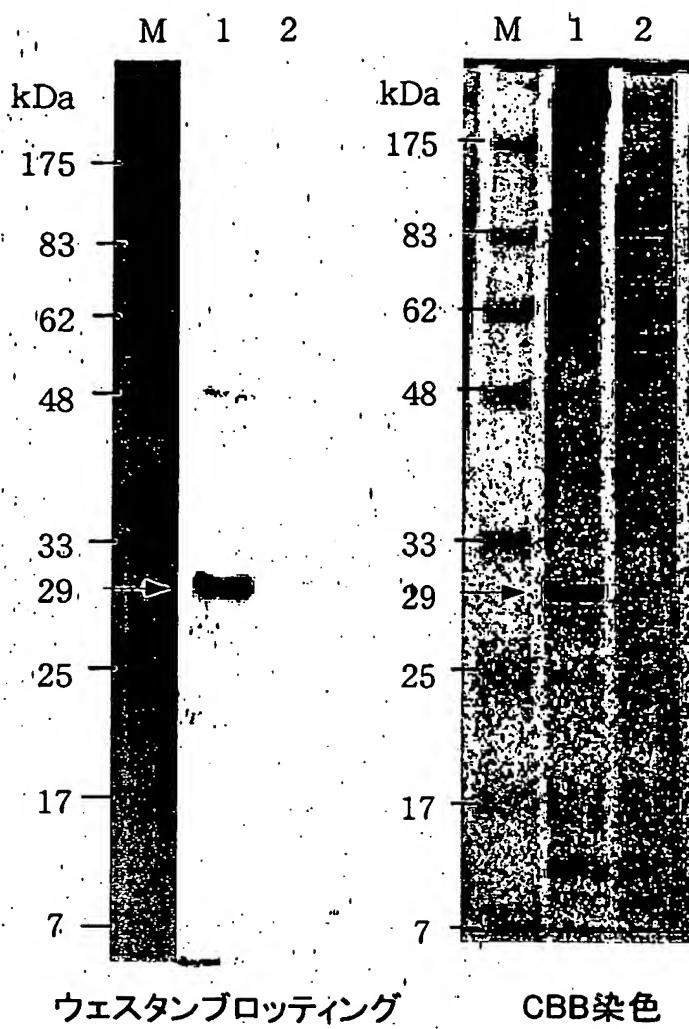
17/22

図17



18/22

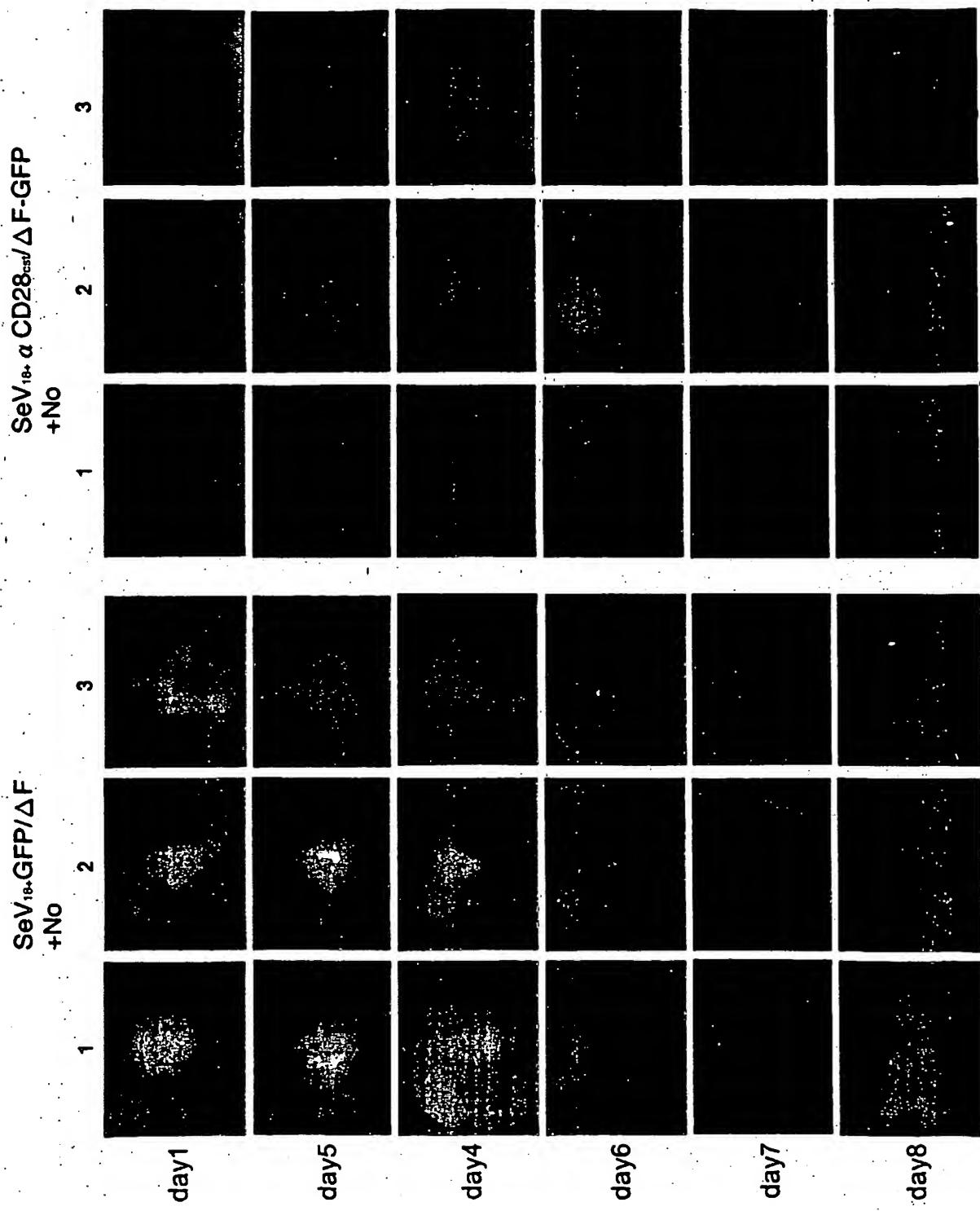
図18



M:蛋白マーカー  
1:SeV18+ $\alpha$ CD28cst/ $\Delta$ F-GFP培養上清  
2:SeV/ $\Delta$ F(GFP)培養上清

19/22

図19



20 / 22

図20

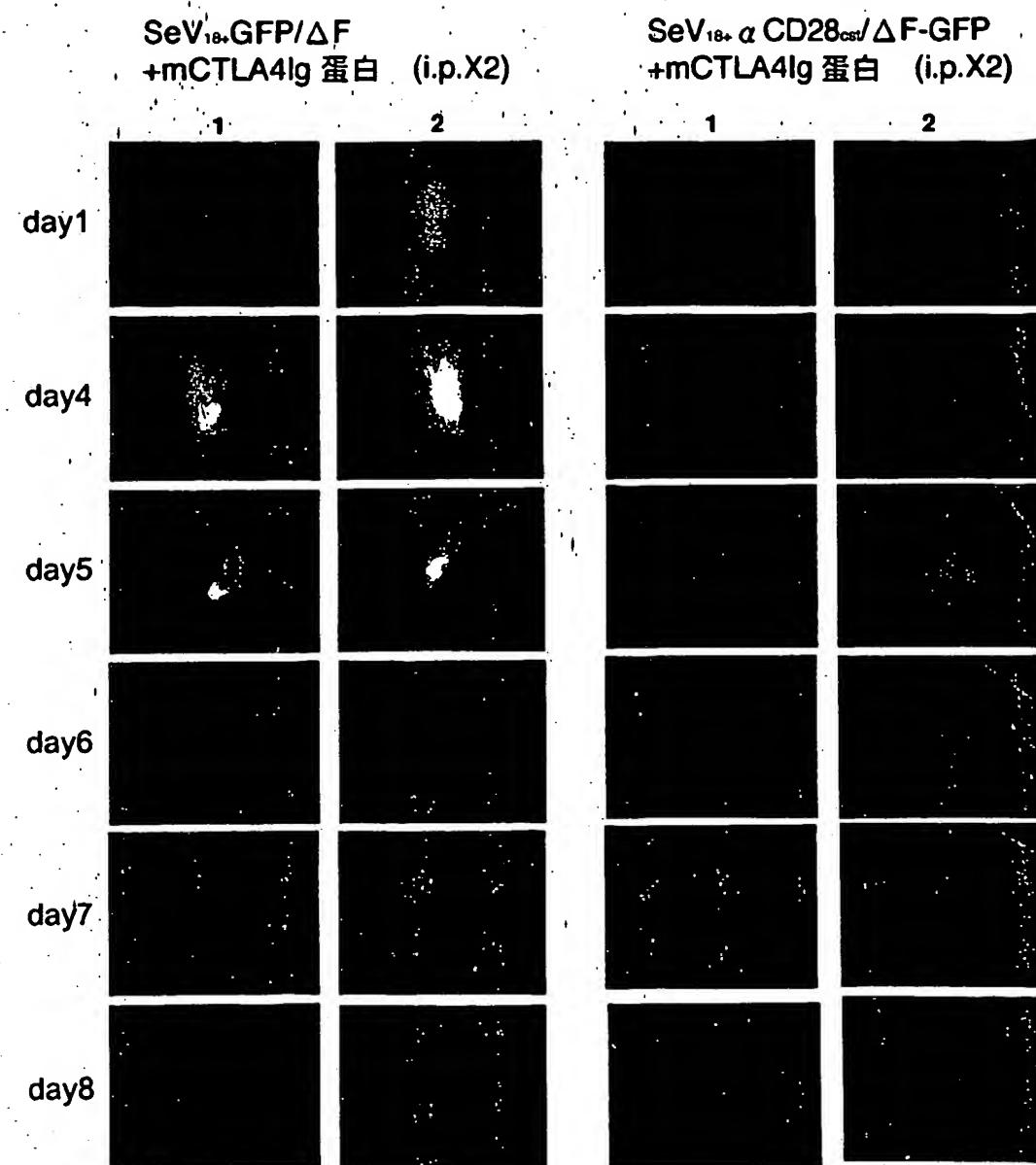
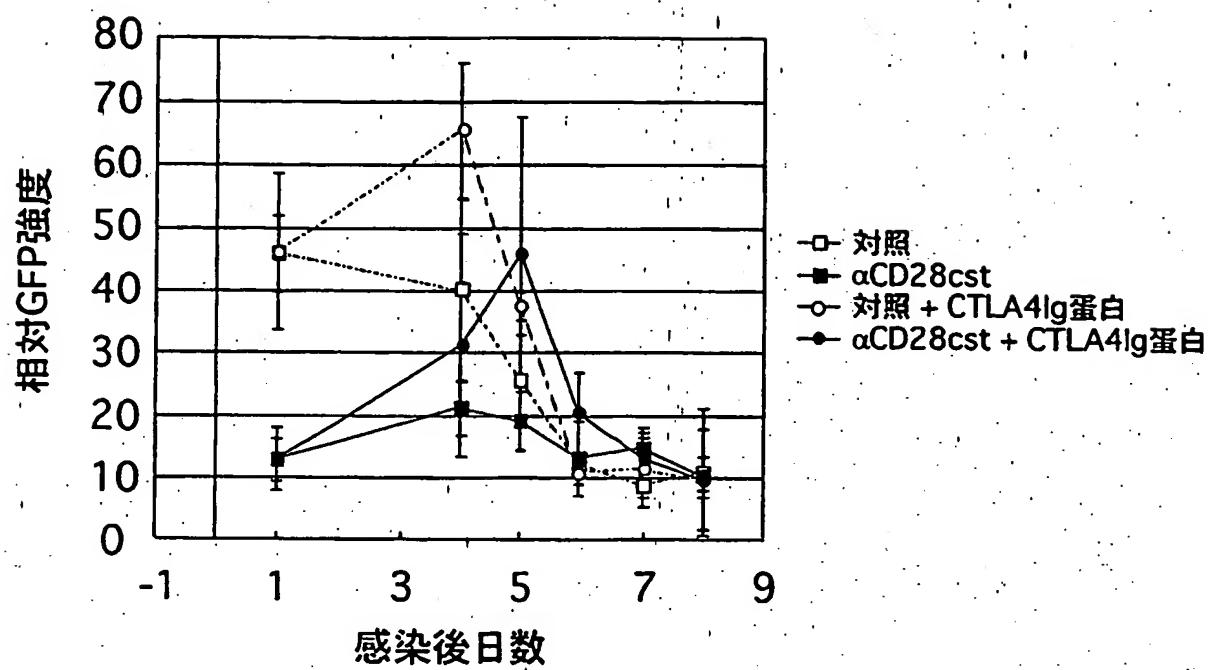
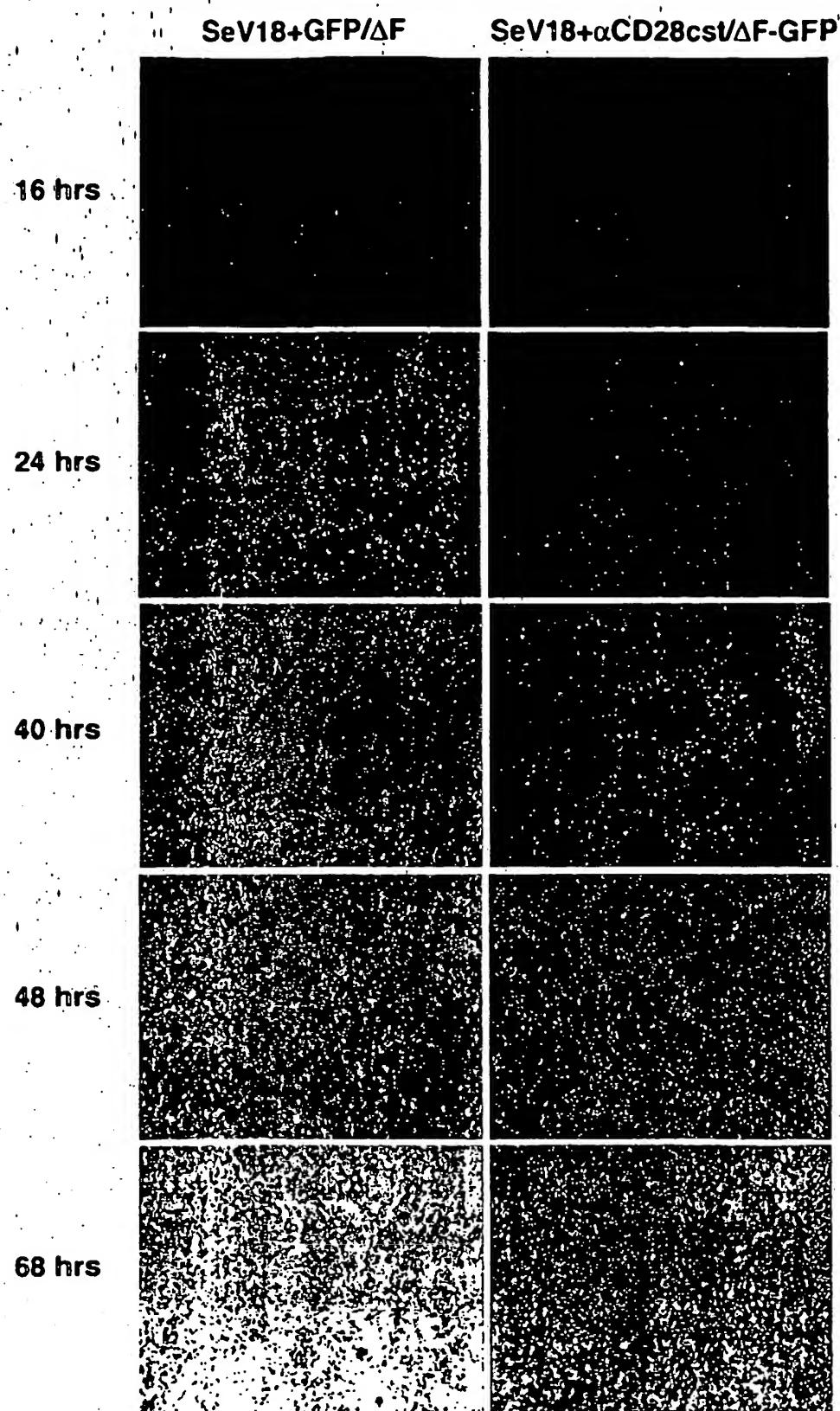


図21



22/22

图 22



## SEQUENCE LISTING

<110> DNAVAC RESEARCH INC.

<120> Antibody-encoding paramyxovirus vectors and their use

<130> D3-A0203P

<150> JP 2002-161964

<151> 2002-06-03

<160> 63

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 10

<212> DNA

<213> Sendai virus

<400> 1

ctttcacccct

10

<210> 2

<211> 15

<212> DNA

<213> Sendai virus

<400> 2

tttttcttac tacgg

15

<210> 3

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Spacer sequence

<400> 3

cggccgcaga tcttcacg

18

<210> 4

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> an spacer sequence

<400> 4

atgcatgccg gcagatga

18

<210> 5

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> a primer for amplifying Sendai virus genome fragment

<400> 5

gttgagttact gcaagagc

18

<210> 6

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> a primer for amplifying Sendai virus genome fragment

<400> 6

tttgcggca tgcgttccaaaggag agtttgcaa cc

42

<210> 7

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> a primer for amplifying Sendai virus genome fragment

<400> 7

atgcgtccgcgcagatga

18

<210> 8

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> a primer for amplifying Sendai virus genome fragment

<400> 8

tgggtgaatg agagaatcag c

21

<210> 9

<211> 1550

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> a gene framgment encoding V regions of antibody IN-1

<220>

<221> CDS

<222> (18)..(749)

<223>

<220>

<221> CDS

<222> (801)..(1505)

<223>

<400> 9

gcggccgccc tacggcc atg aaa aag aca gct atc gcg att gca gtg gca 50

Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala Ile Ala Val Ala

1

5

10

ctg gct ggt ttc gct acc gta gcg cag gcc gaa gtt aaa ctg cat gag 98

Leu Ala Gly Phe Ala Thr Val Ala Gln Ala Glu Val Lys Leu His Glu

15

20

25

tca ggg cct ggg ctg gta agg cct ggg act tca gtg aag ata tcc tgc 146

Ser Gly Pro Gly Leu Val Arg Pro Gly Thr Ser Val Lys Ile Ser Cys

30

35

40

aag gct tct ggc tac acc ttc act aac tac tgg cta ggt tgg gta aag 194

Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Trp Leu Gly Trp Val Lys

45

50

55

cag agg cct gga cat gga ctt gag tgg att gga gat att tac cct gga 242

Gln Arg Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Ile Gly Asp Ile Tyr Pro Gly

60

65

70

75

ggt ggt tat act aac tac aat gag aag ttc aag ggc aag gcc aca ctg 290

Gly Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu

80

85

90

act gca gac aca tcc tcc agc act gcc tac atg cag ctc agt agc ctg 338

Thr Ala Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu

95

100

105

aca tct gag gac tct gct gtc tat ttc tgt gca aga ttt tac tac ggt 386

Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg Phe Tyr Tyr Gly

110

115

120

agt agc tac tgg tac ttc gat gtc tgg ggc caa ggc acc acc acg gtc acc 434

Ser Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr

125

130

135

gtc tcc tca gca aag acc acc cct cct gtc tct gtt tac cct ctg gct cct 482

Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro

140

145

150

155

ggt tct gcg gct cag act aac tct atg gtg act ctg gga tgc ctg gtc 530

Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met Val Thr Leu Gly Cys Leu Val

160

165

170

aag ggc tat ttc cct gag cca gtg aca gtg acc tgg aac tct gga tcc 578

Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Thr Trp Asn Ser Gly Ser

175

180

185

ctg tcc agc ggt gtg cac acc ttc cca gct gtc ctg caa tct gac ctc 626

Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Asp Leu

190

195

200

tac act ctg agc agc tca gtg act gtc ccc tcc agc acc tgg ccc agc 674

Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser Ser Thr Trp Pro Ser

205

210

215

gag acc gtc acc tgc aac gtt gcc cac ccg gct tct agc acc aaa gtt 722

Glu Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val

220

225

230

235

gac aag aaa atc gta ccg cgc gac tgc taaccgtagt aagaaaaact

769

Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg Asp Cys

240

tagggtaaa gttcatcgcg gccgtacggc c atg aaa caa agc act att gca

821

Met Lys Gln Ser Thr Ile Ala

245

250

ctg gca ctc tta ccg tta ctg ttt acc cct gtg aca aaa gcc gac atc

869

Leu Ala Leu Leu Pro Leu Leu Phe Thr Pro Val Thr Lys Ala Asp Ile

255

260

265

gag ctc acc cag tct cca gca atc atg gct gca tct gtg gga gaa act

917

Glu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ala Ala Ser Val Gly Glu Thr

270

275

280

gtc acc atc aca tgt gga gca agt gag aat att tac ggt gct tta aat

965

Val Thr Ile Thr Cys Gly Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Gly Ala Leu Asn

285

290

295

tgg tat cag cgg aaa cag gga aaa tct cct cag ctc ctg atc tat ggt

1013

Trp Tyr Gln Arg Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gly

300

305

310

315

gca acc aac ttg gca gat ggc atg tca tcg agg ttc agt ggc agt gga 1061

Ala Thr Asn Leu Ala Asp Gly Met Ser Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly

320

325

330

tct ggt aga cag tat tct ctc aag atc agt agc ctg cat cct gac gat 1109

Ser Gly Arg Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Ser Ser Leu His Pro Asp Asp

335

340

345

gtt gca acg tat tac tgt caa aat gtg tta agt act cct cgg acg ttc 1157

Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Asn Val Leu Ser Thr Pro Arg Thr Phe

350

355

360

gga gct ggg acc aag ctc gag ctg aag cgc gct gat gct gca ccg act 1205

Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr

365

370

375

gta tcc atc ttc cca cca tcc agt gag cag tta aca tct gga ggt gcc 1253

Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala

380

385

390

395

tca gtc gtg tgc ttc ttg aac aac ttc tac ccc aaa gac atc aat gtc 1301

Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val

400

405

410

aag tgg aag att gat ggc agt gaa cga caa aat ggc gtc ctg aac agt 1349

Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser

415

420

425

tgg act gat cag gac agc aaa gac agc acc tac agc atg agc agc acc 1397

Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr

430

435

440

ctc acg ttg acc aag gac gag tat gaa cga cat aac agc tat acc tgt 1445

Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys

445

450

455

gag gcc act cac aag aca tca act tca ccc att gtc aag agc ttc aac 1493

Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn

460

465

470

475

agg aat gag tgt tagtccgtag taagaaaaac ttagggtaa agttcatgcg gccgc 1550

Arg Asn Glu Cys

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 244

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; an immunoglobulin IN-1 heavy chain

11/45

&lt;400&gt; 10

Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala Ile Ala Val Ala Leu Ala Gly Phe Ala

1

5

10

15

Thr Val Ala Gln Ala Glu Val Lys Leu His Glu Ser Gly Pro Gly Leu

20

25

30

Val Arg Pro Gly Thr Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr

35

40

45

Thr Phe Thr Asn Tyr Trp Leu Gly Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly His

50

55

60

Gly Leu Glu Trp Ile Gly Asp Ile Tyr Pro Gly Gly Tyr Thr Asn

65

70

75

80

Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Thr Ser

85

90

95

Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser

100

105

110

Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg Phe Tyr Tyr Gly Ser Ser Tyr Trp Tyr

115

120

125

Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Lys

130

135

140

Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln

145

150

155

160

Thr Asn Ser Met Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro

165

170

175

Glu Pro Val Thr Val Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val

180

185

190

His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser

195

200

205

Ser Val Thr Val Pro Ser Ser Thr Trp Pro Ser Glu Thr Val Thr Cys

210

215

220

Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Val

225

230

235

240

Pro Arg Asp Cys

<211> 235

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> an immunoglobulin IN-1 light chain

<400> 11

Met Lys Gln Ser Thr Ile Ala Leu Ala Leu Leu Pro Leu Leu Phe Thr

1 5 10 15

Pro Val Thr Lys Ala Asp Ile Glu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met

20 25 30

Ala Ala Ser Val Gly Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Gly Ala Ser Glu

35 40 45

Asn Ile Tyr Gly Ala Leu Asn Trp Tyr Gln Arg Lys Gln Gly Lys Ser

50 55 60

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Thr Asn Leu Ala Asp Gly Met Ser

65 70 75 80

Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Arg Gln Tyr Ser Leu Lys Ile

85 90 95

Ser Ser Leu His Pro Asp Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Asn Val

100

105

110

Leu Ser Thr Pro Arg Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys

115

120

125

Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu

130

135

140

Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe

145

150

155

160

Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg

165

170

175

Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser

180

185

190

Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu

195

200

205

Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser

210

215

220

Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys

225

230

235

<210> 12

<211> 68

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> a synthetic oligonucleotide for constructing a Fab gene fragment

<400> 12

cggaattcgc ggccggcgta cggccatgaa aaagacagct atcgcgattg cagtggcact 60

ggctggtt

68

<210> 13

<211> 70

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> a synthetic oligonucleotide for constructing a Fab gene fragment

<400> 13

tgcagtggca ctggctggtt tcgctaccgt agcgcaggcc gaagttaaac tgcatgagtc 60

agggcctggg

70

&lt;210&gt; 14

&lt;211&gt; 70

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; a synthetic oligonucleotide for constructing a Fab gene fragment

&lt;400&gt; 14

tgcatgagtc agggcctggg ctggtaaggc ctgggacttc agtgaagata tcctgcaagg 60

cttctggcta

70

&lt;210&gt; 15

&lt;211&gt; 60

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; a synthetic oligonucleotide for constructing a Fab gene fragment

<400> 15

actgcagaca catcctccag cactgcctac atgcagctca gtgcctgac atctgaggac 60

<210> 16

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> a synthetic oligonucleotide for constructing a Fab gene fragment

<400> 16

gtgcctgac atctgaggac tctgctgtct atttctgtgc aagattttac tacggtagta 60

<210> 17

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> a synthetic oligonucleotide for constructing a Fab gene fragment

<400> 17

aagattttac tacggtagta gctactggta cttcgatgtc tggggccaag gcaccacggt 60

<210> 18

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> a synthetic oligonucleotide for constructing a Fab gene fragment

<400> 18

cgggatccct gtccagcggt gtgcacacacct tcccagctgt cctgcaatct gaccttaca 60

<210> 19

<211> 70

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> a synthetic oligonucleotide for constructing a Fab gene fragment

<400> 19

cctgcaatct gaccttaca ctctgagcag ctcagtgact gtcccttcca gcacctggcc 60

cagcgagacc

70

<210> 20

<211> 70

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> a synthetic oligonucleotide for constructing a Fab gene fragment

<400> 20

gcacctggcc cagcgagacc gtcacctgca acgttgccta cccggcttct agcaccaaag 60

ttgacaagaa

70

<210> 21

<211> 70

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> a synthetic oligonucleotide for constructing a Fab gene fragment

<400> 21

gccgacatcg agctcaccca gtctccagca atcatggctg catctgtggg agaaactgtc 60

accatcacat

70

<210> 22

<211> 70

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> a synthetic oligonucleotide for constructing a Fab gene fragment

<400> 22

agaaactgtc accatcacat gtggagcaag tgagaatatt tacggtgctt taaattggta 60

tcagcggaaa

70

<210> 23

<211> 70

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> a synthetic oligonucleotide for constructing a Fab gene fragment

<400> 23

taaattggta tcagcggaaa cagggaaaaat ctcctcagct cctgatctat ggtgcaacca 60

acttggcaga

70

<210> 24

<211> 72

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> a synthetic oligonucleotide for constructing a Fab gene fragment

<400> 24

accgctcgag ctgaagcgcg ctgatgctgc accgactgtta tccatcttcc caccatccag 60

tgagcagttta ac

72

<210> 25

<211> 70

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> a synthetic oligonucleotide for constructing a Fab gene fragment

<400> 25

ccatccagtg agcagttAAC atctggaggt gcctcagtcg ttttgcttctt gaacaacttc 60

taccccaaag

70

<210> 26

<211> 70

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> a synthetic oligonucleotide for constructing a Fab gene fragment

<400> 26

gaacaacttc taccccaaag acatcaatgt caagtggaaatttggatggca gtgaacgaca 60

aaatggcgtc

70

<210> 27

<211> 79

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> a synthetic oligonucleotide for constructing a Fab gene fragment.

<400> 27

caagagcttc aacaggaatg agtggtagtc cgttagtaaga aaaacttagg gtgaaagttc 60

atgcggccgc aagcttggg

79

<210> 28

<211> 80

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> a synthetic oligonucleotide for constructing a Fab gene fragment

<400> 28

tgaacgacat aacagctata cctgtgaggc cactcacaag acatcaactt cacccattgt 60

caagagcttc aacaggaatg

80

<210> 29

<211> 70

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> a synthetic oligonucleotide for constructing a Fab gene fragment

<400> 29

gacagcacct acagcatgag cagcaccctc acgttgacca aggacgagta tgaacgacat 60

aacagctata

70

<210> 30

<211> 70

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> a synthetic oligonucleotide for constructing a Fab gene fragment

<400> 30

gtgaacgaca aaatggcgtc ctgaacagtt ggactgatca ggacagcaa gacagcacct 60

acagcatgag

70

<210> 31

<211> 70

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> a synthetic oligonucleotide for constructing a Fab gene fragment

<400> 31

ttactgtcaa aatgtgttaa gtactcctcg gacgttcgga gctgggacca agctcgagcg 60

gaagcttggg

70

<210> 32

<211> 80

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> a synthetic oligonucleotide for constructing a Fab gene fragment

<400> 32

atctggtaga cagtattctc tcaagatcg tagcctgcat cctgacgatg ttgcaacgta 60

ttactgtcaa aatgtgttaa

80

<210> 33

<211> 70

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> a synthetic oligonucleotide for constructing a Fab gene fragment

<400> 33

ggtgcacca acttggcaga tggcatgtca tcgaggttca gtggcagtgg atctggtaga 60

cagtattctc

70

<210> 34

<211> 70

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> a synthetic oligonucleotide for constructing a Fab gene fragment

<400> 34

gcactattgc actggcactc ttaccgttac tgtttacccc tgtgacaaaa gcccacatcg 60

agctcaccca

70

&lt;210&gt; 35

&lt;211&gt; 70

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; a synthetic oligonucleotide for constructing a Fab gene fragment

&lt;400&gt; 35

agaaaaactt agggtaaaag ttcatcgccg ccgtacggcc atgaaacaaa gcactattgc 60

actggcactc

70

&lt;210&gt; 36

&lt;211&gt; 70

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; a synthetic oligonucleotide for constructing a Fab gene fragment

<400> 36

agcaccaaaag ttgacaagaa aatcgtaaccg cgcgactgct aaccgttagta agaaaaactt 60

agggtgaaag

70

<210> 37

<211> 70

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> a synthetic oligonucleotide for constructing a Fab gene fragment

<400> 37

tgactctggg atgcctggtc aaggctatt tccctgagcc agtgacagtg acctggaact 60

ctggatcccg

70

<210> 38

<211> 70

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> a synthetic oligonucleotide for constructing a Fab gene fragment

<400> 38

gtctgtttac cctctggctc ctggttctgc ggctcagact aactctatgg tgactctggg 60

atgcctggtc

70

<210> 39

<211> 70

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> a synthetic oligonucleotide for constructing a Fab gene fragment

<400> 39

tggggccaag gcaccacggt caccgtctcc tcagcaaaga ccactcctcc gtctgtttac 60

cctctggctc

70

<210> 40

<211> 70

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> a synthetic oligonucleotide for constructing a Fab gene fragment

<400> 40

gaggtggtta tactaactac aatgagaagt tcaaggccaa gcccacactg actgcagaca 60

catcctccag

70

<210> 41

<211> 70

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> a synthetic oligonucleotide for constructing a Fab gene fragment

<400> 41

aaagcagagg cctggacatg gacttgagtg gattggagat attaccctg gaggtggtta 60

tactaactac

70

<210> 42

<211> 70

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> a synthetic oligonucleotide for constructing a Fab gene fragment

<400> 42

tcctgcaagg cttctggcta caccttcaact aactactggc taggttgggt aaagcagagg 60

cctggacatg 70

<210> 43

<211> 753

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> an anti-CD28 ScFv antibody gene (SYN205-13)

<400> 43

tctagagaca tcgagctcac tcagtctcca gcttcttgg ctgtgtctct agggcagaga 60

gccaccatct cctgcagagc cagtgagagt gttgaatatt atgtcacaag tttaatgcag 120

tggtaccagc agaagccagg acagccaccc aaactcctca tctttgctgc atccaaacgta 180

gaatctgggg tccctccag gtttagtgtgc agtgggtctg ggacaaactt cagcctcaac 240

atccatccctg tggacggagga ttagtgtgc atgtatttct gttagcaag taggaaggtt 300

ccttacacgt tcggaggggg gaccaagctg gaaataaaac ggggaggcgg cggttctggc 360

ggtggcggat caggtggcgg aggctcgag gtgaaactgc agcagtctgg acctggcctg 420

gtgacgcct cacagaggct gtccatcaact tgtactgtct ctgggttttc attaaggcac 480

tatgggttc actgggttcg ccagtctcca ggacagggac tggagtggct gggagtaata 540

tggctggtg gaggcacgaa ttataattcg gctctcatgt ccagaaagag catcagcaaa 600

gacaactcca agagccaagt ttcttaaaa atgaacagtc tgcaagctga tgacacagcc 660

gtgtattact gtgccagaga taaggatac tcctattact attctatggc ctactgggc 720

caagggacca cggtcactgt ctcctcgctc aga 753

<210> 44

<211> 247

<212> PRT

<213> Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; an anti-CD28 ScFv fragment encoded by SYN205-13

&lt;400&gt; 44

Asp Ile Glu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly

1

5

10

15

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Glu Tyr Tyr

20

25

30

Val Thr Ser Leu Met Gln Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro

35

40

45

Lys Leu Leu Ile Phe Ala Ala Ser Asn Val Glu Ser Gly Val Pro Ala

50

55

60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asn Phe Ser Leu Asn Ile His

65

70

75

80

Pro Val Asp Glu Asp Asp Val Ala Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Arg

85

90

95

Lys Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

100

105

110

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gln

115

120

125

Val Lys Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Thr Pro Ser Gln Ser

130

135

140

Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Asp Tyr Gly

145

150

155

160

Val His Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Leu Gly

165

170

175

Val Ile Trp Ala Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Leu Met Ser

180

185

190

Arg Lys Ser Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys

195

200

205

Met Asn Ser Leu Gln Ala Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg

210

215

220

Asp Lys Gly Tyr Ser Tyr Tyr Tyr Ser Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

225

230

235

240

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

245

<210> 45

<211> 131

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> a NotI fragmnet containing an EIS sequence in pGEM-4Zcst

<400> 45

gcggccgcca aagttcaatg gatttcagg tgcagattt cagttcctg ctaatcagtg 60

cctcagtcat aatgtccaga ggatctagac cgtagtaaga aaaacttagg gtgaaagtcc 120

atcgccggccg c 131

<210> 46

<211> 22

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 46

Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser

1

5

10

15

Val Ile Met Ser Arg Gly

20

&lt;210&gt; 47

&lt;211&gt; 70

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

<223> an synthetic oligonucleotide for constructing an anti-CD28cst  
gene fragment

&lt;400&gt; 47

tctagagaca tcgagctcac tcagtctcca gcttcttgg ctgtgtctct agggcagaga 60

gccaccatct

70

&lt;210&gt; 48

&lt;211&gt; 70

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

<223> an synthetic oligonucleotide for constructing an anti-CD28cst  
gene fragment

&lt;400&gt; 48

agggcagaga gccaccatct cctgcagagc cagttagatgttgaatatt atgtcacaag 60

tttaatgcag

70

&lt;210&gt; 49

&lt;211&gt; 70

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

<223> an synthetic oligonucleotide for constructing an anti-CD28cst  
gene fragment

&lt;400&gt; 49

atgtcacaag tttaatgcag tggtaaccaggc agaaggccagg acagccaccc aaactcctca 60

tctttgctgc

70

&lt;210&gt; 50

<211> 70

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> an synthetic oligonucleotide for constructing an anti-CD28cst  
gene fragment

<400> 50

ccttacacgt tcggaggggg gaccaagctg gaaataaaac ggggaggcgg cggttctggc 60

ggtgtggcggat

70

<210> 51

<211> 70

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> an synthetic oligonucleotide for constructing an anti-CD28cst  
gene fragment

<400> 51

cggttctggc ggtggcggat caggtggcgg aggctcgcag gtgaaaactgc agcagtcgg 60

acctggcctg

70

&lt;210&gt; 52

&lt;211&gt; 70

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

<223> an synthetic oligonucleotide for constructing an anti-CD28cst  
gene fragment

&lt;400&gt; 52

agcagtctgg acctggcctg gtgacgcct cacagagcct gtccatcaact tgtactgtct 60

ctgggttttc

70

&lt;210&gt; 53

&lt;211&gt; 70

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

<223> an synthetic oligonucleotide for constructing an anti-CD28cst  
gene fragment

<400> 53

gacaactcca agagccaagt tttcttaaaa atgaacagtc tgcaagctga tgacacagcc 60

gtgttattact

70

<210> 54

<211> 70

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> an synthetic oligonucleotide for constructing an anti-CD28cst  
gene fragment

<400> 54

tgacacagcc gtgttattact gtgccagaga taaggatac tccttattact attctatgga 60

ctactggggc

70

<210> 55

<211> 53

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> an synthetic oligonucleotide for constructing an anti-CD28cst  
gene fragment

<400> 55

tctagacgag gagacagtga ccgtggtccc ttggcccaag tagtccatag aat 53

<210> 56

<211> 70

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> an synthetic oligonucleotide for constructing an anti-CD28cst  
gene fragment

<400> 56

actggctct tggagttgtc ttggctgatg ctcttctgg acatgagagc cgaattataa 60

ttcgtgcctc

70

<210> 57

<211> 70

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> an synthetic oligonucleotide for constructing an anti-CD28cst  
gene fragment

<400> 57

cgaattataa ttctgtgcctc caccagccca tattactccc agccactcca gtccctgtcc 60

tggagactgg

70

<210> 58

<211> 70

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> an synthetic oligonucleotide for constructing an anti-CD28cst  
gene fragment

<400> 58

gtccctgtcc tggagactgg cgaacccagt gaacaccata gtcgcttaat gaaaacccag 60

agacagtaca

70

<210> 59

<211> 70

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> an synthetic oligonucleotide for constructing an anti-CD28cst  
gene fragment

<400> 59

ccccctccga acgtgttaagg aacccctccta ctttgctgac agaaaatacat tgcaacatca 60

tcctcgatcca

70

<210> 60

<211> 70

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> an synthetic oligonucleotide for constructing an anti-CD28cst  
gene fragment

<400> 60

tgcaacatca tcctcgcca caggatggat gttgaggctg aagttgtcc cagaccact 60

gccactaaac

70

<210> 61

<211> 70

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> a synthetic oligonucleotide for constructing an anti-CD28cst  
gene fragment

<400> 61

cagaccact gccactaaac ctggcaggga ccccgaggatc tacgttggat gcagcaaaga 60

tgaggagttt

70

<210> 62

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> a synthetic primer F6

<400> 62

acaagagaaa aaacatgtat gg

22

<210> 63

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> a synthetic primer R199

<400> 63

gataacagca cctcctcccg act

23

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/07005

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl' C12N15/09, 7/00, A61K35/76, 39/395, 48/00, A61P19/08,  
25/00, 37/06, 43/00, C07K16/18, 16/28, C12P21/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl' C12N15/09, 7/00, A61K35/76, 39/395, 48/00, A61P19/08,  
25/00, 37/06, 43/00, C07K16/18, 16/28, C12P21/02

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

PubMed, BIOSIS/WPI (DIALOG)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Li HO, et al., A cytoplasmic RNA vector derived from nontransmissible Sendai virus with efficient gene transfer and expression., J.Virol., 2000 July, Vol. 74, No.14, pages 6564 to 6569	1-15, 20-23
Y	Masaki I. et al., Angiogenic gene therapy for experimental critical limb ischemia: acceleration of limb loss by overexpression of vascular endothelial growth factor 165 but not of fibroblast growth factor-2., Circ.Res., 17 May, 2002 (17.05.02), Vol. 90, No. 9, pages 966 to 973	1-15, 20-23

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

## \* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
01 September, 2003 (01.09.03)Date of mailing of the international search report  
16 September, 2003 (16.09.03)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No..

PCT/JP03/07005

## C.(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Inouye RT. et al., Potent inhibition of human immunodeficiency virus type 1 in primary T cells and alveolar macrophages by a combination anti-Rev strategy delivered in an adeno-associated virus vector., J.Virol., 1997 May, Vol.71, No.5, pages 4071 to 4078	1-15,20-23
Y	Liang XH. et al., Expression of a biologically active antiviral antibody using a sindbis virus vector system., Mol.Immunol., 1997 August-September, Vol.34, No.12-13, pages 907 to 917	1-15,20-23
Y	MORIMOTO, K. et al., High level expression of a human rabies virus-neutralizing monoclonal antibody by a rhabdovirus-based vector., J. Immunol.Methods., 01 June, 2001 (01.06.01), Vol.252, No.1-2, pages 199 to 206	1-15,20-23
Y	Brosamle C., et al., Regeneration of lesioned corticospinal tract fibers in the adult rat induced by a recombinant, humanized IN-1 antibody fragment., J.Neurosci., 01 November, 2000 (01.11.00), Vol.20, No.21, pages 8061 to 8068	7,8
Y	Yu XZ. et al., CD28-specific antibody prevents graft-versus-host disease in mice., J.Immunol., 01 May, 2000 (01.05.00), Vol.164, No.9, pages 4564 to 4568	6,9-13,21-23

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No..

PCT/JP03/07005

**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.: 16-19

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claims 16 to 19 pertain to methods for treatment of the human body by therapy.

2.  Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3.  Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

No protest accompanied the payment of additional search fees.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int Cl' C12N 15/09, 7/00, A61K 35/76, 39/395, 48/00, A61P 19/08, 25/00, 37/06, 43/00,  
C07K 16/18, 16/28, C12P 21/02

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int Cl' C12N 15/09, 7/00, A61K 35/76, 39/395, 48/00, A61P 19/08, 25/00, 37/06, 43/00,  
C07K 16/18, 16/28, C12P 21/02

## 最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

## 国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

PubMed, BIOSIS/WPI (DIALOG)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	Li HO, et al., A cytoplasmic RNA vector derived from nontransmissible Sendai virus with efficient gene transfer and expression., J Virol. 2000 Jul, vol. 74, no. 14, p. 6564-6569.	1-15, 20-23
Y	Masaki I, et al., Angiogenic gene therapy for experimental critical limb ischemia: acceleration of limb loss by overexpression of vascular endothelial growth factor 165 but not of fibroblast growth factor-2., Circ Res. 2002 May 17, vol. 90, no. 9, p. 966-973.	1-15, 20-23

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に旨及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

## の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

01.09.03

国際調査報告の発送日

16.09.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

小暮 道明

4B 9358



電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C(続き)	関連すると認められる文献	関連する 請求の範囲の番号
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	
Y	Inouye RT, et al., Potent inhibition of human immunodeficiency virus type 1 in primary T cells and alveolar macrophages by a combination anti-Rev strategy delivered in an adeno-associated virus vector., J Virol. 1997 May, vol. 71, no. 5, p. 4071-4078.	1-15, 20-23
Y	Liang XH, et al., Expression of a biologically active antiviral antibody using a sindbis virus vector system. Mol Immunol. 1997 Aug-Sep, vol. 34, no. 12-13, p. 907-917.	1-15, 20-23
Y	Morimoto K, et al., High level expression of a human rabies virus-neutralizing monoclonal antibody by a rhabdovirus-based vector., J Immunol Methods. 2001 Jun 1, vol. 252, no. 1-2, p. 199-206.	1-15, 20-23
Y	Brosamle C, et al., Regeneration of lesioned corticospinal tract fibers in the adult rat induced by a recombinant, humanized IN-1 antibody fragment., J Neurosci. 2000 Nov 1, vol. 20, no. 21, p. 8061-8068.	7, 8
Y	Yu XZ, et al., CD28-specific antibody prevents graft-versus-host disease in mice., J Immunol. 2000 May 1, vol. 164, no. 9, p. 4564-4568.	6, 9-13, 21-23

## 第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT 17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1.  請求の範囲 16-19 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、上記請求の範囲に記載された発明は、人の身体の治療による処置方法に係るものである。
2.  請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3.  請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1.  出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2.  追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3.  出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4.  出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

## 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**